

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**La esfingosina-1-fosfato liasa como herramienta terapéutica
para modular los niveles de esfingosina-1- fosfato y reducir
los déficits funcionales causados por la lesión medular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María de los Ángeles del Águila Sánchez

Directores

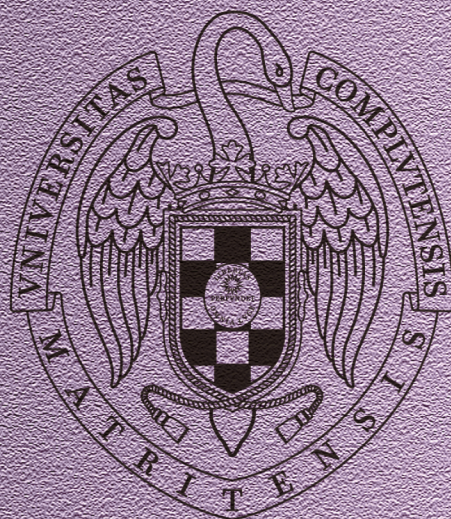
**Manuel Nieto-Díaz
Rodrigo Martínez Maza**

Madrid, 2018

TESIS DOCTORAL

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas



*La esfingosina-1-fosfato liasa como
herramienta terapéutica para modular los
niveles de esfingosina-1-fosfato y reducir los
déficits funcionales causados por la
lesión medular*

Autora

María de los Ángeles del Águila Sánchez

Directores

Manuel Nieto Díaz

Rodrigo Martínez Maza

2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología molecular I

LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO LIASA COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA PARA
MODULAR LOS NIVELES DE ESFINGOSINA-1-FOSFATO Y REDUCIR LOS DÉFICITS
FUNCIONALES CAUSADOS POR LA LESIÓN MEDULAR

Memoria presentada por
MARÍA DE LOS ÁNGELES DEL ÁGUILA SÁNCHEZ
Para optar al grado de
DOCTOR EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

VºBº de los directores de esta tesis:

Dr. Manuel Nieto-Díaz
Grupo de Neuroprotección Molecular
Hospital Nacional de Paraplégicos
Toledo, España

Dr. Rodrigo Martínez Maza
Grupo de Neuroprotección Molecular
Hospital Nacional de Paraplégicos
Toledo, España



Don Manuel Nieto Díaz, doctor en Ciencias Biológicas, y Don Rodrigo Martínez Maza, doctor en Bioquímica y Biología molecular, e investigadores responsables del Grupo de Neuroprotección Molecular (GNPM) perteneciente a la Unidad de Investigación del Hospital Nacional de Paraplégicos (SESCAM)

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado “LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO LIASA COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA PARA MODULAR LOS NIVELES DE ESFINGOSINA-1-FOSFATO Y REDUCIR LOS DÉFICITS FUNCIONALES CAUSADOS POR LA LESIÓN MEDULAR”, presentado por Doña María de los Ángeles del Águila Sánchez para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo su supervisión en el laboratorio del Neuroprotección Molecular del Hospital Nacional de Paraplégicos (SESCAM) en Toledo y reúne, a su juicio, todos los requisitos para ser defendida ante el tribunal correspondiente

Para que conste a los efectos oportunos, expedimos y firmamos el presente certificado

En Toledo, a 27 de Febrero de 2017

Dr. Manuel Nieto-Díaz
Grupo de Neuroprotección Molecular
Hospital Nacional de Paraplégicos
Toledo, España

Dr. Rodrigo Martínez Maza
Grupo de Neuroprotección Molecular
Hospital Nacional de Paraplégicos
Toledo, España



HOSPITAL
NACIONAL DE
PARAPLÉJICOS
Toledo



Fundación del
Hospital Nacional
de Paraplégicos
para la Investigación
y la Integración



Fundació
La Marató de TV3

Este trabajo ha sido realizado entre marzo de 2012 y febrero de 2017 en el laboratorio del grupo de Neuroprotección Molecular, a cargo de los Doctores Rodrigo Martínez Maza y Manuel Nieto Díaz, en el Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo. La autora ha sido financiada por la Fundació La Marató de TV3 a través de una beca asociada al proyecto “Sphingolipids as targets for the recovery from spinal cord injuries: Deciphering the role of sphingosine-1-phosphate” (expediente 11231-2).

A mis padres y a mis hermanos

Os quiero

*“Distorsiona las teorías para adaptarlas a los hechos,
en vez de los hechos a las teorías”*
(Sherlock Holmes)

“La ausencia de evidencia no es evidencia de ausencia”
(Konstantin Tsiolkovski)

“Si torturas los números lo suficiente, confesarán cualquier cosa”
(Darrell Huff; *How to lie with Statistics*)

*“Es mejor escribir para uno mismo y no encontrar público,
que escribir para el público y no encontrarse uno mismo”*
(Cyril Conolly)

“El límite está en la imaginación...”
(Desconocido)

AGRADECIMIENTOS

Resulta paradójico que lo primero que van a leer de esta tesis sea lo último que se ha sido escrito y lo que menos rigor científico tiene como tal. Como me dijo un gran amigo y conocedor de la materia, esta es la parte más personal, donde puedo explicar y expresarme como quiera y sienta. Y con esa libertad escribo. Nunca he sido de excesivas muestras de cariño habladas, siempre he pensado que las palabras se las lleva el viento y que son los hechos, día a día, los que demuestran realmente los sentimientos, porque, cuando éstos son sinceros, no hay palabras que los describan fielmente. Espero haber sido capaz de demostraros a todos, día tras día, cuán agradecida estoy porque hayáis formado parte de mi vida y por haberme acompañado en este arduo camino. Así pues, sólo espero que estas líneas que siguen sean para vosotros la confirmación de lo que ya sabéis y aprovechar así para rendiros un pequeño homenaje.

En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Manuel Nieto Díaz y al Dr. Rodrigo Martínez Maza, mis directores de tesis, mis jefes (aunque siempre he defendido que esa palabra no os hace justicia, porque para mí no sois jefes, sois líderes) y dos pilares fundamentales sin los que no hubiese sido posible nada de esto. Tengo tanto que agradeceros que no sé ni por dónde empezar. Gracias por apostar por mí desde el inicio y embarcaros en una nueva línea de investigación de la que ninguno teníamos mucha idea. Ha sido un comienzo desde cero y un duro recorrido hasta el final pero siempre habéis estado ahí para ayudarme y avanzar juntos.

Manuel, ¿qué puedo decir de ti? *Coff, coff...*: “Oh, su vucencia, blondo ojizarco; es menester hacer paladina mi gratitud hacia usía por ser indiscutible maese de aquesta investigadora en ciernes, circumspecta y ávida de conocimientos *ab initio*, por su bonhomía y su reglaje, por iluminarme para intentar escudriñar los angostos, oscuros y eviternos misterios de la ciencia, por no mostrar hastío alguno ante mi nesciencia y por su paciencia con mi idiolecto, así como por mostrar su desasosiego al saberme decumbente”. (¿Cómo te quedas?, ¿eh?). Ya en serio, nada de lo que diga será suficiente. Han sido cinco años trabajando, literalmente, codo con codo, durante más horas que un reloj. Gracias por apoyarme en todo, a nivel profesional y a nivel personal. Gracias por confiar en mí y darme voz en muchas ocasiones en las que, quizás, ni siquiera yo me la hubiese dado. Gracias por ayudarme a crecer, por enseñarme con infinita paciencia y por aguantar todas y cada una de mis preguntas, que no han sido pocas. Gracias por darme la libertad de plantear mis propias cuestiones sobre esta investigación, por guiarme y enseñarme a pensar como se debe pensar en ciencia. Gracias por reconocer mi esfuerzo y hacérmelo saber, por alegrarte conmigo en las buenas y animarme y cuidarme en las malas, lejos de mi tierra madre: Almería (donde sí que hay mucha humedad y sí, también desierto...). Y, en definitiva, gracias por demostrarme que siempre puedo contar contigo y por haber sido un apoyo indispensable para mí. Echaré de menos nuestros ratos de reflexiones varias sobre tantas y tantas cuestiones, nuestras discusiones por hasta cada coma y el saber encontrar ese conjunto común entre tu pensamiento de líneas verticales y mi pensamiento de líneas horizontales que, al unirse en la intersección, suman. Infinitas gracias por todo. (P.d.: y aquí un puntángela =D).

Rodrigo, mi gran serendipia. El primer recuerdo que tengo sobre ti fue llegar el primer día y recibirme en la puerta con un: “— ¿Y tú qué haces aquí? —Vengo a trabajar, es mi primer día...”. Parecías frío, distante y que no conocías el sentido del humor. Ingenua de mí... ¡No podía haber estado más equivocada! Pero las cosas no son como empiezan sino como acaban y, en este tiempo, he tenido la fortuna de descubrir al Rodrigo más cercano; indiscutible profesional y grandísima persona.

Gracias por todo: por tu preocupación, tu dedicación por enseñarme, por tu paciencia, tu ayuda y tus ánimos para conmigo en todo momento. Gracias por tus correcciones y por aportarme nuevos puntos de vista para seguir mejorando. Gracias por tener respuestas a casi todas mis preguntas (¿cómo puede alguien saber tanto de temas tan dispares? Es algo que no deja de sorprenderme y que sé que añoraré el día de mañana). Has sido mi otro maestro y apoyo en este tiempo y sin ti nada de esto hubiese sido posible. Muchas, muchas gracias.

Dicho esto, sólo me queda decir: Manuel, Rodrigo, sois un referente para mí. Os quiero, os respeto y os admiro. Ojalá algún día yo llegue a ser y a significar para alguien aunque sea la décima parte de lo que vosotros sois y significáis para mí. Os estaré eternamente agradecida por todo lo que habéis hecho por mí. De corazón, muchas gracias.

Dr. David Reigada (*a.k.a.*: Deivid), desde que llegué a esta casa como técnico de laboratorio, te preocupaste en enseñarme muchas de las técnicas que conozco, a mostrarme los “secretos” del criostato, entre otras muchas cosas, y me ayudaste a desenvolverme en los inicios, cuando más perdida estaba. Aunque haya llovido desde entonces, no puedo olvidarme de esa parte ni dejar de seguir agradeciéndotelo. En todo este tiempo nunca has dudado en aparcar por momentos tu trabajo para ayudarme en lo que he necesitado y en esta última etapa has sido un gran apoyo para mí; has tenido la paciencia de leer para comprender cada parte de esta tesis, la honradez de darme tu opinión más sincera y objetiva en todo momento y, sobre todo, te has ofrecido voluntario a si necesitaba cualquier cosa que no dudase en contar contigo. Quiero decirte que te estoy muy muy agradecida por todo. Mil gracias.

Dra. Teresa Muñoz (*a.k.a.*: Tesu, Teresu...), gracias por apoyarme en todo momento, por preocuparte por mí, por ayudarme sobre mis infinitas dudas en la parte farmacológica y otros muchos campos y por echarme una mano amiga siempre que te he necesitado (véase: “Angueluki, flÓh, ¿necesitas algo? Si es así, aquí estamos. Pide por esa boquita”. ¡Auténtica!). Gracias también por ser mi compañera de habitación en primera línea de playa (no quisiera yo volver a despertar ningún resquemor al respecto, pero...), con la increíble vista panorámica de la costa barcelonesa, el despertar con los primeros rayos de sol, la majestuosa inmensidad del mar ante nuestro balcón y el sonido de las olas de fondo... (=D). Tesu, mi dulce camarada, aún me pregunto si sería posible escuchar de tu boca algún exabrupto. Nah, no lo creo. Parece casi imposible mermar tu compostura y te aplaudo por ello. ¡Me queda tanto por aprender! Gracias por todo.

Dr. Marcos Caballero (*a.k.a.*: Markis), tú lo definiste a la perfección por lo que permíteme que me haga eco de tus palabras –aunque un poco adaptadas–: Manuel, tu y yo siempre hemos sido más búhos que alondras y nuestras tardes han sido de esas tardes que siempre quedarán en la memoria. Tardes de crítica profesional constructiva, de procrastinación con cavilaciones más que surrealistas, de risas hasta el llanto y de tomar un necesario respiro para volver y darlo todo en este trabajo, independientemente de las adversidades que quisieran detenernos. Gracias por hacer más llevaderos los días, por hacerme sonreír sorprendiéndome al encontrar tus notas escondidas dándome ánimos y gracias por llevarnos por bandera a tantos rincones del mundo. Muchas gracias.

Irene (*a.k.a.*: Sirenilla), tu paso por el laboratorio, aunque relativamente corto, dejó una clara huella. Demostraste tus ganas por aprender, por avanzar y por superarte cada día y cuando se te ha presentado un reto por delante no has dudado en, como quien dice, remangarte, recogerte el pelo y decir: ¿Qué no puedo? ¡Ja! Olé por ti. Gracias por preocuparte por mí y por este trabajo, por tu talante talaverano y por cuidarnos con tus ricos manjares culinarios. Ahora estás a un paso de convertirte en maestra de Ciencias Forenses y, desde aquí, quiero darte todos mis ánimos para que cumplas todos tus objetivos, como has hecho desde que te conozco y como tú me has animado siempre a mí. Gracias y ánimo.

He de decir que me siento afortunada de haber sido parte, todos estos años, de esta gran familia formada por grandes personas y con un objetivo en común: seguir avanzando y ayudando al prójimo siempre. No sé cómo hubiera sido este camino de haber sido de otra forma, en otro lugar y/o con otra gente, pero estoy totalmente convencida de que no podría haber sido mejor. Incluso con sus malos momentos porque esos, esos son los que nos han unido aún más. Me llevo lo mejor de cada uno de vosotros. Muchas gracias por todo, a todos.

Quiero darle las gracias también Gema Barroso, Verónica Darde, Alba González y Ana Gallardo, del Servicio de Proteómica del Hospital Nacional de Paraplégicos (HNP) por su participación y ayuda en este trabajo. En especial, gracias a Gema por iniciarme en Analyst y Skyline y contestar con increíble paciencia mis innumerables dudas sobre el mundo de la proteómica. Del mismo modo, quiero agradecer a Javier Mazarío y José Ángel Rodríguez, responsables del Servicio de Microscopía y Análisis de imagen del HNP, por su inestimable ayuda en la obtención de las imágenes de inmunohistoquímica de este trabajo.

Fuera del HNP, tengo mucho que agradecer también a la Dra. Fina Casa, la Dra. Gemma Fàbrias y al Dr. Antonio Delgado del Instituto de Química Orgánica Avanzada de Cataluña, porque este trabajo comenzó como una colaboración, dándonos la oportunidad de indagar en el mundo conjunto de los esfingolípidos y la lesión medular; trabajo hoy convertido en mi tesis doctoral. Gracias por vuestra cálida acogida y eterna amabilidad recibéndome en Barcelona para enseñarme personalmente y permitirme la posibilidad de entender de primera mano el procesado y la obtención de datos de los análisis de esfingolipidómica realizados en este trabajo. Gracias por ello también a Eva Dalmau y al Dr. Pol Sanllehí. Muchas gracias.

PhD. Paul Gesse, muchas gracias por nuestras incontables charlas constructivas, por compartir conmigo opiniones y conocimientos, por ayudarme cuando lo he necesitado y por no dudar en sentarte conmigo y hacerme ver las cosas un poco más positivas en esos momentos en los que parecía que todo andaba mal. Muchas gracias por estar ahí. A ti y a tu familia.

Amanda Esteban, muchas gracias por tu apoyo incondicional, tu confianza y tu paciencia. Gracias por las miles y miles de horas al teléfono en la lejanía, por escucharme y ser mi confidente en infinitas ocasiones, por hacerme desconectar en mis escapadas a Almería, por esas tardes de CCC (café-cena-copa) hasta el amanecer. Gracias por tantas risas, anécdotas, locuras y, en definitiva, gracias por tanta vida compartida desde enanas. Siempre lo he dicho y no cambiará, eres como una hermana para mí. Mi hermana pequeña. Gracias enana, a ti y a Jesús, un ángel que llegó para quedarse.

Encarni Abad y Gloria Jiménez, gracias por cuidar y conservar nuestra amistad, nacida bajo el manto de la Química en la Universidad de Almería. Gracias por no dejar que el tiempo ni la distancia hicieran mella. Aunque nunca ha sido fácil, hemos conseguido unir Francia, Toledo y Almería para tomarnos un café y ponernos al día cada vez que ha sido posible. Sois de esa clase de gente que sabes que, aunque pase tiempo sin hablar, si la necesitas va a estar y eso... Eso es muy grande. En serio. Muchas gracias.

También quiero hacer una mención especial por su paciencia conmigo, su preocupación por este trabajo y sus ánimos constantes a la Dra. Cayetana M., a Carmen Daniela, a Patricia, a Ana y a las maravillosas guardianas de nuestro castillo: Toñi, Marisol, Mercedes... ¡Gracias a todas!

Por último, pero por supuestísimo no menos importante, quiero darle las gracias a mi familia.

Quiero empezar por mis hermanos, Antonio Jesús y Miguel Ángel, sus respectivas parejas y su progenie. Gracias Antonio (*a.k.a.*: xikitin; bro) y Mari Carmen (*a.k.a.*: cuñañada) por tantas horas de viaje compartidas desde el centro peninsular. Por acogerme en fines de semana, por preocuparos por mí, por escucharme, por hacerme saber que estaréis siempre ahí y por darme a esos ángeles que tengo por sobrinos (Aarón y Oliver) cuyos abrazos, especialmente en este último tiempo, han sido una fuente de energía y felicidad para mí. Muchas gracias. Ángel (*a.k.a.*: Maikel), gracias a ti también porque, entre otras muchas cosas y aunque casi inconscientemente, iniciaste esto. Todo comenzó con un comentario de pasada sobre una oferta de trabajo que al final se ha convertido en seis años en el Toledo y esta tesis fruto de ello. Gracias Amanda, mi cuñada, por tu apoyo en este tiempo y nuestras risas y gracias a ambos por mis otros dos ángeles, mis maravillosos y adorables sobrinos (Dani y Amanda) que completan la alegría de la familia. Muchas gracias.

Y, finalmente, gracias a mis padres, Antonio y María, porque gracias a ellos hoy estoy aquí (y esto sirve para siempre, porque esté donde esté, llegue donde llegue, siempre será gracias a ellos). Gracias por cuidarme, quererme y escucharme siempre. Gracias por inculcarme principios y valores. Gracias por enseñarme disciplina y hacerme entender que las cosas se consiguen pero que no llegan solas. Por enseñarme que todo esfuerzo tiene recompensa y que no hay mejor recompensa que hacer las cosas lo mejor que uno sea capaz y con esa tranquilidad y satisfacción sentirse orgulloso del trabajo hecho. Gracias por apoyarme en todos mis proyectos, por inalcanzables que pareciesen. Siempre me habéis preguntado: “¿Crees que puedes? Si es que sí, adelante”. Gracias por no cortarme las alas y dejarme volar libremente buscando mi camino, mi sueño, mi pasión y lo que me hace feliz. Gracias por ser mis padres y hacerme ser, en gran medida, quien —y lo que— soy a día de hoy. Os quiero muchísimo.

¡Gracias a todos!

“Si quieres llegar rápido, camina solo. Si quieres llegar lejos, camina acompañado”

(Dicho Masai)

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen/Summary	7
Introducción.....	17
Lesión medular	19
Fisiopatología de la lesión medular	20
Fases de la LME: fase primaria	21
Fases de la LME: fase secundaria	22
Fases de la LME: fase crónica	24
Modelos experimentales de lesión medular	25
Abordaje actual en el tratamiento contra la LME.....	26
Esfingolípidos.....	27
Estructura de los esfingolípidos.....	27
Metabolismo de los esfingolípidos.....	29
Funciones de los esfingolípidos.....	31
Implicación de los esfingolípidos en diversas patologías	32
La esfingosina-1-fosfato.....	33
Metabolismo, transporte y señalización	33
Funciones	35
Estrategias de modulación de la S1P y sus efectos.....	37
La esfingosina-1-fosfato liasa	38
Hipótesis y Objetivos	43
Materiales y Métodos	47
Procedimientos <i>in vivo</i>	49
<i>Animales utilizados y declaración de cumplimiento de la legislación vigente.....</i>	<i>49</i>
<i>Genotipado de ratones transgénicos SPL+/+ y SPL+/-.....</i>	<i>49</i>
Disoluciones y primers (cebadores) utilizados	50
Procedimiento	51
Extracción de ADN.....	51
Amplificación de genes mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasaa (PCR)	52
Resolución por electroforesis en gel de agarosa	52
<i>Modelo murino de LME por contusión: procedimiento quirúrgico</i>	<i>53</i>
<i>Evaluación comportamental.....</i>	<i>55</i>
<i>Evaluación Motora</i>	<i>55</i>
Basso Mouse Scale (BMS)	55
Rotarod.....	59
Versamax: <i>Open Field Activity Monitoring system</i>	59
<i>Evaluación Sensitiva</i>	<i>59</i>
Test de Von Frey	59
Test de la placa caliente.....	63
Test de la acetona.....	63
Procedimientos <i>in vitro</i>	63
<i>Líneas celulares empleadas y su mantenimiento</i>	<i>63</i>
<i>Ensayo de viabilidad celular (MTT).....</i>	<i>64</i>
Disoluciones empleadas.....	64

Procedimiento.....	64
Técnicas moleculares.....	65
<i>Determinación de la concentración de esfingolípidos</i>	65
Materiales utilizados	65
Extracción de muestras	65
Procedimiento	66
Análisis de los resultados	67
<i>Monitorización de múltiples reacciones</i>	67
Extracción y preparación de las muestras	68
Secuencias seleccionadas para MRM.....	69
Procedimiento.....	69
Análisis de resultados.....	71
Control de calidad (I): relaciónn señal/ruido.....	71
Control de calidad (II): tiempos de retención.....	71
Control de calidad (III): transiciones inconsistentes.....	73
Control de calidad (IV): muestras inconsistentes	76
Normalización de los datos	76
<i>Medición de la concentración de proteínas (BCA)</i>	77
<i>Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) e</i> <i>inmunomarcado (Western Blot)</i>	78
Anticuerpos y disoluciones utilizadas.....	78
Extracción de las muestras	80
Extracción de muestras de origen <i>in vivo</i>	80
Extracción de muestras procedentes de cultivos celulares Neuro2a (N2a)	81
Procedimiento.....	81
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	81
Tinción de geles con Azul de Coomassie	83
Electrotransferencia húmeda	83
Inmunomarcado.....	84
Tinción de membranas con Rojo Ponceau S	85
Análisis de resultados.....	85
<i>Análisis de expresión génica</i>	85
Sondas utilizadas	85
Extracción de las muestras	85
Procedimiento.....	85
Extracción de ARN total	86
Tratamiento con ADNsa y retrotranscripción de ARN a cADN	86
PCR semicuantitativa (qPCR).....	87
Análisis de resultados.....	89
<i>Determinación de la actividad de SPL</i>	89
Materiales utilizados	90
Extracción de las muestras	90
Procedimiento.....	90
Análisis de resultados.....	91

Histología	91
Extracción de las muestras	91
<i>Disoluciones empleadas</i>	91
<i>Procedimiento</i>	91
Tinción con eriocromo-cianina	92
<i>Disoluciones y reactivos utilizados</i>	93
<i>Procedimiento</i>	93
<i>Análisis de resultados</i>	94
Inmunohistoquímica (IHQ)	94
<i>Anticuerpos y disoluciones utilizados</i>	94
<i>Procedimientos</i>	95
Inmunohistoquímica general	95
Inmunohistoquímica utilizando el Kit M.O.M.	96
<i>Análisis de resultados: cuantificación de células neurales</i>	97
Conteo de neuronas	97
Conteo de oligodendrocitos	103
Conteo de microglía	109
Conteo de astrocitos	113
Análisis estadístico	113
Regresión de Cox	113
Diagrama de cajas y bigotes (Box plot)	114
Test de Dixon	115
Normalidad y homocedasticidad	116
Análisis estadístico mediante el test de la t de Student	116
Test ANOVA y test post-hoc de Tukey	117
Test de Kruskal-Wallis y el test post-hoc de Conover	118
Test múltiple de Wilcoxon	118
Regresión lineal	120
Capítulo - I: Caracterización del sistema de esfingolípidos tras la lesión medular	121
Introducción	123
Resultados	124
<i>Procesado de datos: control de calidad y preparación de matrices para su análisis</i>	124
<i>Médula espinal, sangre y suero presentan perfiles esfingolipídicos característicos</i>	128
<i>Cambios en la concentración de esfingolípidos en médula espinal tras la lesión</i>	131
La lesión medular no altera la concentración total de esfingolípidos	131
...pero sí la concentración de especies individuales	131
<i>Los cambios en la concentración de los esfingolípidos N-acilados C16 tras la LME están interrelacionados</i>	133
<i>La concentración de Sph está estrechamente relacionada con la de dhSph</i>	136
<i>La S1P muestra un patrón de cambio de concentración propio, relacionado con la concentración de Sph</i>	137
<i>Cambios en la concentración de esfingolípidos en sangre y suero</i>	140
<i>¿Son la GluCer22:1 o la GluCer18:0 potenciales biomarcadores de LME?</i>	143
Discusión	143

Capítulo - II: Caracterización de la esfingosina-1-fosfato liasa tras la lesión medular	153
Introducción	155
Resultados	156
<i>Análisis global de las proteínas implicadas en el metabolismo y la señalización de S1P</i>	<i>156</i>
Control de calidad y preparación de los datos para su análisis	156
Análisis de los cambios de expresión	160
<i>La expresión de SPL varía en médula espinal tras la LME</i>	<i>162</i>
<i>La expresión de Sgpl1 aumenta progresivamente tras la LME.....</i>	<i>164</i>
<i>La actividad enzimática de SPL también varía tras la LME.....</i>	<i>165</i>
Ensayo de actividad SPL: determinación del tiempo óptimo de incubación.....	165
Ensayo de actividad SPL: determinación de la concentración óptima de extracto proteico de médula espinal	166
Análisis de la actividad enzimática de SPL.....	167
Discusión	169
Capítulo - III: Efectos de la inhibición génica parcial de la esfingosina-1-fosfato liasa	179
Introducción	181
Resultados	182
<i>Los ratones SPL+/- presentan una expresión reducida de Sgpl1 en médula espinal</i>	<i>182</i>
<i>Efectos de la deficiencia en Sgpl1 sobre los daños inducidos por la lesión medular</i>	<i>185</i>
Análisis de la función motora	186
Análisis de la función sensitiva	195
Análisis histológicos	202
Análisis de la preservación tisular	202
Análisis de la preservación celular	205
Los cambios de expresión génica de Sgpl1 tras la LME son similares entre ratones WT y ratones SPL+/-	208
<i>La deficiencia parcial de Sgpl1 aumenta la expresión proteica de SPL en la médula espinal pero no altera los cambios de expresión tras la LME</i>	<i>210</i>
<i>La deficiencia parcial de Sgpl1 no influye en la actividad enzimática de SPL</i>	<i>214</i>
<i>La deficiencia génica de Sgpl1 altera la concentración de algunos esfingolípidos sin afectar a la de S1P</i>	<i>220</i>
Discusión	224
Capítulo - IV: Nuevos inhibidores farmacológicos de la esfingosina-1-fosfato liasa	231
Introducción	233
Resultados	235
<i>RBM-7.32 y RX-116: los inhibidores más eficaces y menos tóxicos</i>	<i>235</i>
<i>RBM-6.24, RBM-7.12 y RBM-7.32 inhiben la actividad enzimática de SPL en células intactas.....</i>	<i>240</i>
<i>RX-116, a su IC₅₀, no es capaz de revertir los efectos citotóxicos del etopósido en células N2a</i>	<i>242</i>
Otros resultados interesantes en curso... ..	246
Administración in vivo de los inhibidores RX-116 y RBM-7.32: estudios preliminares ...	246
Expresión proteica de SPL en células N2a: ¿una isoforma truncada?	247
Discusión	249

Conclusiones	255
Bibliografía.....	259
Material suplementario.....	277

ABREVIATURAS

18S: Ácido ribonucleico ribosomal 18S

2VS1P: 2-vinilesfinganina-1-fosfato

ABC: *ATP-binding Cassette Transporters*;

Transportadores dependientes de la unión de ATP

ABCA1: *ATP-binding Cassette Transporter A1*;

Transportador A1 dependiente de la unión de ATP

ABCC1: *ATP-binding Cassette Transporter C1*;

Transportador C1 dependiente de la unión de ATP

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNasa: Desoxirribonucleasa

Akt: Proteína quinasa B

ANOVA: *Analysis of variance*; Análisis de la varianza

APC: *Adenomatous Polyposis Coli Protein*;

Proteína de la poliposis adenomatosa familiar

APS: *Ammonium perfulphate*: persulfato amónico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Ribonucleasa

ATP: Adenosín trifosfato

Bcl2: *B-cell lymphoma 2*; linfoma 2 de células B

BCA: *Bicinchoninic acid assay*; Ensayo del ácido bicinconínico

BHE: Barrera hemato-encefálica y hemato-medular

BMS: *Basso Mouse Scale*; Escala de locomoción Basso para ratón

BSA: Albúmina de suero bovina

CADN: Ácido desoxirribonucleico complementario

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

CDasa: Ceramidasa

CDK: *Cyclin-dependent kinase*; Quinasa dependiente de ciclina

Cer: Ceramida

CerS: Ceramida sintasa

CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*; Regulador transmembrana de la fibrosis quística

Ctrl: Control

Ct: Ciclo umbral

C-terminal: Extremo carboxilo terminal

C.V.: Coeficiente de variación

DAPI: Dicloruro de 4',6-diamino-2-fenilindol

dhCer: Dihidroceraamida

dhSM: Dihidroesfingomielina

dhSph: Dihidroesfingosina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Modificación de Dulbecco del medio de Eagle

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DOP: 4-desoxipiridoxina

Dpo: Días post-operación (equivalente a días post-lesión)

DTT: 1,4-ditiotreitol

ECL: *Enhanced chemoluminescence assay*;

Ensayo de quimioluminiscencia potenciada

Edg: *Endothelial Differentiation Gene*; Gen de diferenciación endotelial

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

Et al.: *Et alii*; Y colaboradores

EtBr: Bromuro de etidio

EtOH: Etanol

Erk: *Extracellular signal-regulated kinase*;

Quinasa regulada por señales extracelulares

Eto: Etopóxido

Exp.: Experimento

FAM: Fluoresceína

FBS: *Fetal Bovine Serum*; Suero fetal bovino

FDA: *Food and Drug Administration*; Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos

FRET: *Fluorescence resonance energy transfer* (Transferencia de energía de resonancia en fluorescencia)

F.S: Fallo en el spike

Gal: β -galactosidasa

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*; Proteína

ácida fibrilar glial

Glu: Glutamina

GluCer: Glucosilceramida

GTPasa: Guanosina trifosfatasa

H₂O_{mQ}: Agua milliQ

HNP: Hospital Nacional de Parapléjicos

HRP: *Horseradish peroxidase*; Peroxidasa de rábano

IB4: Isolectina B4

IC: Índice de correlación

IC50: Concentración media inhibitoria

IC95%: Intervalo de confianza al 95%

IHQ: Inmunohistoquímica

iNOS: *Inducible nitric oxide synthase*; Óxido nítrico sintasa inducible

IQR: Rango intercuartilico

JNK: *c-Jun N-terminal Kinase*; Quinasa c-Jun N-terminal

kDa: KiloDalton

Kdinas: Kilodinas

LacCer: Lactosilceramida

LacZ: Gen de la β-galactosidasa

LDL: *Low density lipoprotein*; Lipoproteína de baja densidad

LME: Lesión medular espinal

LOD: *Limite of detection*; Límite de detección

LOQ: *Limite of quantification*; Límite de cuantificación

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

mARN: ARN mensajero

MeOH: Metanol

MRM: *Multiple reaction monitoring*;

Monitorización de múltiples reacciones

mTOR: *Mammalian target of rapamycin*; Diana para rapamicina en mamíferos

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

N.D.: No detectado

N2a: Línea celular de neuroblastoma murino (Neuro2a)

N-terminal: Extremo amino terminal

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NEAA: Aminoácidos no-esenciales

NeuN: *Neuronal nuclei protein*; Proteína nuclear neuronal

NF-kB: *Nuclear factor kappa B*; Factor nuclear kappa B

NFQ: *Non-fluorescent quencher*; Quencher no fluorescente

NGF: *Nerve growth factor*; Factor de crecimiento nervioso

NP-40: Nonidet-P40

NUSE: *Normalized Unscaled Standard Error*; Normalización del error estándar no escalado

O/N: *Overnight*. Toda la noche

O.C.T: *Optimum cutting temperature medium*; Medio de inclusión

P/S: Penicilina/estreptomicina

p/v: Peso soluto/volumen total

Pág.: Página

PBS: Tampón fosfato salino

pb: Pares de bases

PKC: *Protein kinase C*; Proteína quinasa C

PCR: *Polymerase chain reaction*; Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehído

p(BH): Probabilidad ajustada (Benjamini y Hochberg)

PLP: Piridoxal-5'-fosfato

P.M: Peso molecular

PVDF: Difloruro de Polivinilideno

Pyr: Piruvato

R/T: *Room Temperature*; Temperatura ambiente

R.T: *Retention time*; Tiempo de retención

Ras: *Rat sarcoma protein*; Proteína de sarcoma de rata

RMA: *Robust multichip analysis*; Análisis robusto de múltiples chips

RIPA: *Radio-immunoprecipitation assay buffer*;

Tampón de radio-inmunoprecipitación

ROS: *Reactive oxygen species*; Especies reactivas de oxígeno

RT-qPCR: Retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

rpm: Revoluciones por minuto

S1P: Esfingosina-1-fosfato

S1PR(1-5): Receptores de esfingosina-1-fosfato (1-5)

S.D.: Desviación estándar

SDS: Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

SESCAM: Servicio de Salud de Castilla La Mancha

Sgpl1: Gen codificante de la SPL

SM: Esfingomielina

SNC: Sistema nervioso central

Sph: Esfingosina

SphK1: Esfingosina quinasa I

SphK2: Esfingosina quinasa II

SPL: Esfingosina-1-fosfato liasa

SPT: Serina palmitoil transferasa

SPP(1 ó 2): Esfingosina-1-fosfato fosfatasa (1 ó 2)

SRM: *Selected reaction monitoring*;

Monitorización de reacción seleccionada

Sts: Estaurosporina

Sup.Mat: Material suplementario

S/R: Relación señal/ruido

T8-T10: Vértebra torácica 8-10

TBS-T: *Tris Buffered Saline-Tween*; Tampón tris salino con Tween® 20

TBE: Tampón Tris Borato EDTA

TEMED: N,N,N,N-Tetrametiletilendiamina

THI: 2-acetil-5-tetrahidroxibutilimidazol

TNFalfa: *Tumor necrosis factor alpha*; Factor de necrosis tumoral alfa

TNFR: *Tumor necrosis factor alpha receptor*; Receptor del factor de necrosis tumoral alfa

UPLC-MS: *Ultra Performance Liquid*

Chromatography – Mass Spectrometry;

Cromatografía líquida de ultra presión acoplada a un espectrómetro de masas

UPLC-MS/MS: *Ultra Performance Liquid*

Chromatography – Tandem Mass Spectrometry;

Cromatografía líquida de ultra presión acoplada a un espectrómetro de masas en tándem

UU.AA.: Unidades arbitrarias

V/v: Volumen soluto/volumen total

v.g.: *Verbi gratia*; Por ejemplo

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLDL: *Very low density lipoprotein*; Lipoproteína de muy baja densidad

WB: Western blot

WT: *Wild Type*. Ratones silvestres

Y col.: Y colaboradores

RESUMEN/SUMMARY

Antecedentes

Las lesiones traumáticas de la médula espinal son causa de discapacidad en más de cien mil personas en todo el mundo cada año. La lesión medular (LME) tiene una compleja fisiopatología que incluye múltiples eventos, respuestas y procesos interrelacionados que afectan a los sistemas nervioso, vascular e inmune y que cambian a lo largo del tiempo. Al inicio del curso temporal de la LME, el trauma inicial desencadena una serie de alteraciones vasculares, cambios bioquímicos y respuestas celulares secundarias que exacerban el daño inicial. El pronóstico de la LME depende estrechamente de las características de esta fase secundaria, incluyendo el incremento de la apoptosis, la infiltración de células inmunes y la respuesta inflamatoria, las alteraciones en la permeabilidad de la barrera hemato-medular, los procesos de degeneración Walleriana y desmielinización, la reactividad glial y la cicatriz glial, así como las respuestas neuroregenerativas. La caracterización de las vías de señalización y los mecanismos subyacentes a todos estos procesos implicados en el daño secundario resulta fundamental para identificar nuevas dianas sobre las cuales desarrollar estrategias terapéuticas efectivas enfocadas a reducir los déficits funcionales inducidos por la lesión LME.

Recientes evidencias sugieren que los esfingolípidos juegan un papel activo tras el daño en el Sistema Nervioso Central (SNC) así como en diferentes patologías neurodegenerativas. Los esfingolípidos son una clase de lípidos basados en un esqueleto de esfingosina a partir del cual se generan una gran variedad de familias de esfingolípidos mediante fosforilación (v.g.: esfingosina-1-fosfato), acilación (v.g.: ceramidas), así como por adición de fosfocolina (esfingomielinas) o de residuos de azúcar (v.g.: cerebrósidos y gangliósidos). Aunque conocidos principalmente por papel como lípidos estructurales en la biología de membranas, algunos esfingolípidos actúan como moléculas de señalización en procesos de proliferación, supervivencia, apoptosis, migración y diferenciación celular. A pesar de su potencial, aún no se han desarrollado análisis detallados sobre el sistema de esfingolípidos en la médula lesionada. Los escasos estudios existentes indican que varios esfingolípidos podrían participar en procesos clave de la LME. En particular, análisis en modelos de lesión medular han establecido que la esfingosina-1-fosfato (S1P), un esfingolípidos con numerosas funciones en el SNC, promueve la migración de células madre neurales hacia el sitio de la lesión. Estudios adicionales empleando un análogo funcional de S1P sugieren que la concentración de este lípido bioactivo podría ser clave en la modulación de la respuesta inmune, la permeabilidad vascular o la reactividad glial tras la LME. Estas evidencias señalan a la S1P como una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de la lesión medular. La señalización de S1P puede ser modificada mediante análogos funcionales, como mencionamos anteriormente, pero también actuando sobre las diferentes enzimas de la ruta metabólica de los esfingolípidos. En este sentido, algunos estudios han demostrado el potencial terapéutico de modular la expresión o actividad de la S1P liasa (SPL), la enzima responsable de la degradación irreversible de S1P.

Hipótesis y objetivos

Considerando las evidencias disponibles y asumiendo que: 1) es posible mejorar el pronóstico de la lesión medular actuando sobre su fase secundaria; 2) la S1P participa en la regulación de procesos como la apoptosis, la reactividad glial o la inflamación que, a su vez, tienen lugar durante la fase secundaria de la LME; y 3) los niveles de S1P dependen de la expresión y actividad de SPL, hipotetizamos que:

1. Los cambios que se producen tras una LME alteran los niveles de esfingolípidos.
2. Los cambios en los niveles de esfingolípidos contribuyen a la fisiopatología de la LME.
3. El aumento de los niveles de S1P repercute beneficiosamente en la evolución de una LME.
4. La inhibición de la SPL permite incrementar los niveles de S1P.

El presente estudio tiene como objetivo general contrastar estas hipótesis y explorar el potencial terapéutico de incrementar la concentración de S1P mediante la inhibición de SPL para promover la recuperación funcional en la médula espinal dañada. Para alcanzar este objetivo, definimos los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterizar los cambios de concentración de los esfingolípidos que ocurren durante la fase subaguda de la LME.
2. Caracterizar los cambios de expresión (génica y proteica) y actividad enzimática de la SPL durante la fase subaguda de la LME.
3. Evaluar si la inhibición parcial de la expresión de Sgpl1 induce mejoras funcionales y/o sensoriales tras la LME.
4. Evaluar la viabilidad y la efectividad de nuevos inhibidores farmacológicos de la SPL.

Resultados y Conclusiones

1. Caracterización de los cambios de concentración de los esfingolípidos durante la fase subaguda de la LME. En este primer objetivo empleamos técnicas de esfingolipidómica (UPLC-MS) para analizar muestras de médula espinal, sangre y suero extraídas a diferentes tiempos durante las tres primeras semanas tras la lesión en un modelo murino de lesión medular por contusión. Los resultados de estos análisis revelaron un perfil de esfingolípidos propio de cada tejido que se mantiene prácticamente inalterado tras la LME. En la médula espinal, los análisis mostraron que la lesión induce cambios locales en la concentración de un conjunto definido de especies, incluyendo la S1P, las bases esfingoides (Sph y dhSph) y varias especies N-aciladas C16. Estos estudios también revelaron una estrecha relación entre la concentración de S1P y la concentración de su precursor (esfingosina) que se mantiene tras la lesión excepto a los 3 días tras la operación y en menor medida a los 21 días. La lesión también induce cambios en la concentración de varias especies de esfingolípidos en sangre y suero, incluyendo GluCer22:1 y GluCer18:0, que podrían servir como biomarcadores tempranos de la lesión medular.

2. Caracterización de los cambios de expresión (génica y proteica) y actividad enzimática de la SPL durante la fase subaguda de la LME. La caracterización proteómica de la expresión de las enzimas responsables del metabolismo de S1P, empleando UPLC-MS/MS, indica que la lesión medular induce cambios locales en la expresión de SPL, la enzima responsable de la degradación irreversible de S1P, así como en otras enzimas. Estudios adicionales mediante WB confirmaron un aumento de la expresión de SPL a tiempos tempranos tras el trauma, sugiriendo que su inhibición podría promover un aumento temprano de la concentración de S1P e identificando la SPL como una potencial diana terapéutica para la lesión medular. Sin embargo, el perfil de cambio de la expresión proteica de SPL difiere del perfil de expresión génica y del de actividad enzimática, hecho que debería ser tenido en cuenta en el diseño de nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en la modulación de SPL.

3. Evaluación de los efectos de la inhibición parcial de la expresión de Sgpl1 sobre la recuperación funcional tras la LME. En estos ensayos se emplearon ratones transgénicos con deficiencia parcial en el gen Sgpl1, que codifica la enzima SPL. Los análisis histológicos y comportamentales revelaron que la reducción de la expresión génica de SPL podría mejorar la recuperación funcional tras la lesión medular, aunque los resultados no fueron concluyentes. Posteriores análisis mediante qRT-PCR, western blot y ensayos de actividad enzimática revelaron que la inhibición parcial de Sgpl1 no altera los cambios inducidos por la LME en la expresión o actividad de SPL ni en la concentración de S1P en la médula espinal dañada. Estos resultados sugieren que las mejoras funcionales observadas tras la LME en ratones parcialmente deficientes en Sgpl1 podrían ser debidos a artefactos o bien ser consecuencia de cambios ajenos a la médula espinal, posiblemente en el sistema inmune.

4. Evaluación de la viabilidad y la efectividad de nuevos inhibidores farmacológicos de la SPL. En este apartado se emplearon ensayos in vitro para evaluar nuevos inhibidores farmacológicos de SPL. Los estudios revelaron que dos de estos compuestos (RBM-7.32 y RX-116) son capaces de inhibir eficazmente la actividad enzimática de SPL sin inducir efectos tóxicos relevantes en la línea celular neural Neuro2a. Sin embargo, en las condiciones empleadas, la inhibición parcial de la actividad de SPL resultó ineficaz a la hora de proteger a cultivos del neuroblastoma Neuro2a frente a una estimulación apoptótica.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que, de acuerdo con las hipótesis propuestas, la lesión en la médula espinal altera la concentración local de varios esfingolípidos, incluida la S1P. De acuerdo con estudios previos, algunos de estos cambios podrían contribuir a diferentes eventos que se producen en la fisiopatología de la lesión medular. Sin embargo, la falta de efectividad a la hora de modular la expresión y/o actividad de la enzima SPL en la médula espinal dañada no ha permitido testar los efectos de la inhibición de SPL sobre la concentración de S1P ni los efectos terapéuticos del incremento local de la concentración de S1P.

Background

Trauma to the spinal cord causes permanent and incurable disabilities in more than a hundred thousand people every year worldwide. The pathophysiology of the spinal cord injury (SCI) is a complex intermingled set of events, responses, and processes that affect the nervous, vascular and immune systems during the days and months that follow the damage. The initial trauma triggers a series of secondary vascular alterations, biochemical disturbances and cellular responses that exacerbate the initial damage. The functional outcome from SCI largely depends on prominent features of this secondary phase, including increased apoptosis, immune cell infiltration and inflammatory responses, alterations in blood-spinal cord barrier permeability, Wallerian degeneration and demyelination, glial reactivity and glial scar, as well as neuro-regenerative responses. Characterizing the pathways and the mechanisms underlying the secondary damage is basic to identify targets on which to develop effective therapeutic strategies aimed to restrict the functional deficits induced by the SCI.

Recent evidences suggest that sphingolipids play an active role following injury to the Central Nervous System (CNS) as well as in different neurodegenerative diseases. Sphingolipids are a class of bioactive lipids characterized by a sphingosine backbone upon which a large and complex network of families is built up by phosphorylation (vg. Sphingosine-1-phosphate), acylation (vg. ceramides), addition of phosphocoline headgroup (sphingomyelins) or sugar residues (cerebrosides and gangliosides, i.e. glycosphingolipids). Best known for their crucial roles in membrane biology, several sphingolipid metabolites function as signalling molecules in proliferation, survival, apoptosis, motility, and differentiation pathways. The few existing studies indicate that sphingolipid metabolites can play active roles in different processes of the SCI. Studies in SCI models have established that sphingosine-1-phosphate (S1P), a sphingolipid metabolite with pleiotropic effects in the CNS, promotes the migration of neural stem cells towards the injury site. Additional studies using S1P analogues suggest that the concentration of this bioactive lipid may be also key for the immune response, the vascular permeability and the glial reactivity occurring after SCI. Altogether, these evidences identify S1P as a promising therapeutic target for the treatment of spinal cord injury. S1P signalling can be modified using analogues as previously mentioned but also acting on different enzymes of the sphingolipid pathway. In this respect, several studies have demonstrated the therapeutic potential of modulating the expression or activity of S1P lyase (SPL), the enzyme responsible for the irreversible degradation of S1P. Despite their potential, detailed analyses on the sphingolipid system and its modulation in SCI are still lacking.

Hypothesis and Objectives

Considering the available evidences and the following assumptions:

1. Functional recovery from SCI can be improved acting on the processes that occur during the secondary phase.
2. S1P participates in key processes occurring during the secondary phase of SCI, such as apoptosis, inflammatory response, or glial reactivity.
3. S1P concentration depends on the expression and activity of SPL.

The present study hypothesizes that:

1. Injuries to the spinal cord alter the local concentration of sphingolipids.
2. The changes in sphingolipid levels contribute to SCI pathophysiology.
3. Local increases in S1P concentration will benefit functional recovery after SCI.
4. Inhibition of SPL allows increasing S1P levels.

The present study aims to test these hypotheses and to explore the therapeutic potential of inhibiting SPL to increase S1P concentration and promote functional recovery in the damaged spinal cord. To reach this general aim, we have defined the following partial objectives:

1. To characterize the changes in the concentration of sphingolipids during the secondary phase of the SCI.
2. To characterize the gene expression, protein concentration and enzymatic activity of SPL during the secondary phase of the SCI.
3. To evaluate whether partial inhibition of Sgpl1 gene expression is able to induce functional improvements in SCI models.
4. To evaluate the effectiveness of new pharmacological inhibitors to modulate SPL activity in neural cells and the injured spinal cord.

Results and Conclusions

1. To characterize the changes in the concentration of sphingolipids during the secondary phase of the SCI. Sphingolipidomic analyses of spinal cord, blood, and serum samples extracted at different days during the first three weeks after injury in a mice model of contusive SCI revealed that each of the analysed tissues has its own specific sphingolipid profile, different from the other tissues and mostly preserved after SCI. At the spinal cord, injury induces local changes in the concentration of a restricted set of sphingolipid species, including S1P, both dhSph and Sph sphingoid bases, and various N-acyl C16 species. The studies also reveal that S1P increases its concentration after injury, in direct relationship with a raise in Sph concentration except at 3 and 21 dpo. Besides the changes in the spinal cord, injury also modifies the blood and serum concentration of various sphingolipid species, including GluCer22:1 and GluCer18:0 which may function as early biomarkers of SCI.

2. To characterize the gene expression, protein concentration and enzymatic activity of SPL during the secondary phase of the SCI. Proteomics characterization of the expression of the enzymes responsible for S1P metabolism indicated that SCI induce local changes in the expression of SPL, the enzyme that irreversibly degrades S1P, as well as in other enzymes. Further analyses confirmed a raise in SPL expression early after injury, suggesting that its inhibition may promote an early increase of S1P concentration and identifying SPL as a potential target for SCI treatment. However, SPL protein expression profiles strongly disagree with the Sgpl1 gene expression and the SPL enzymatic activity profiles, a phenomenon that should be taken into account in the design of therapeutic approaches based on the modulation of SPL.

3. To evaluate whether partial inhibition of Sgpl1 gene expression is able to induce functional improvements in SCI models. The behavioural and functional analyses using transgenic mice with partial deficiency in Sgpl1 revealed that reducing the expression of SPL may improve functional recovery from SCI, although results were not conclusive. Moreover, qPCR, immunoblotting and enzyme activity assays revealed that Sgpl1 partial deficiency neither affects the changes in SPL expression or activity in the damaged spinal cord, nor alters its S1P concentration. These evidences suggest that functional improvements after injury in Sgpl1 partially deficient mice are either an artefact or the result from SPL changes outside the spinal cord, most likely at the immune system.

4. To evaluate the effectiveness of new pharmacological inhibitors to modulate SPL activity in neural cells and the injured spinal cord. In vitro testing of SPL pharmacological inhibitors revealed that at least two of the tested compounds (RBM-7.32 and RX-116) are effective inhibitors of SPL activity without relevant toxic effects for the neural cell line Neuro2a. However, in the present studies the tested SPL inhibitors did not prove effective in protecting Neuro2a cell from apoptotic stimulation.

Altogether, the obtained results demonstrate that, in agreement with the proposed hypotheses, injuries to the spinal cord alter the local concentration of various sphingolipids, including S1P. According to prior data, some of these changes may contribute to different events of SCI pathophysiology. However, failure to effectively modulate SPL, both gene expression and enzymatic activity, in the injured spinal cord has prevented testing its effects on S1P concentration and the therapeutic effects of increasing the local concentration of S1P.

INTRODUCCIÓN

LESIÓN MEDULAR

La primera referencia escrita sobre una lesión medular espinal (LME) data del año 2.500- 3.000 a.C (Figura I.1). En ella se describe a un hombre con el cuello roto que presentaba parálisis en las cuatro extremidades, abolición de la sensibilidad, priapismo, vejiga retencionista con goteo continuo y musculatura atrofica. En el tratamiento médico aparecía anotado: *“dolencia para no tratar”* (caso 31; ver Hughes, 1988). Desde entonces y hasta mediados del s.XX, la LME era considerada prácticamente una *“sentencia de muerte”* ya que *“si la lesión por sí misma no era fatal, las complicaciones derivadas de ella, sí lo eran.”* (Liverman et al., 2005). Aunque esta concepción de la LME pueda parecer arcaica, aun durante la Primera Guerra Mundial muchas de las bajas registradas fueron debidas a traumatismos medulares y sus complicaciones, tales como infecciones urinarias y úlceras por presión. Afortunadamente, gracias a los avances en áreas como la cirugía, la rehabilitación o la enfermería, una LME ya no es considerada una sentencia de muerte.

Actualmente, el término lesión medular, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013), hace referencia a *“los daños sufridos en la médula espinal resultado de un traumatismo (v.g.: un accidente de coche) y en menor medida de procesos patológicos o neurodegenerativos (v.g.: cáncer)”*. Las secuelas de las lesiones incluyen pérdidas sensitivas y motoras en el tronco y las extremidades, pérdida de la regulación autónoma (involuntaria) de funciones corporales como la respiración, la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, el control de la temperatura corporal, el control de la función intestinal y la vejiga o la función sexual, junto con alteraciones neurológicas como la espasticidad o el dolor neuropático crónico (Fehlings et al., 2012). Como se muestra



Figura I.1. Papiro de Edwin Smith. La imagen ilustra un fragmento del papiro descubierto por Edwin Smith en 1.980 d.C, donde se describe por primera vez observaciones anatómicas, diagnóstico, tratamiento y pronóstico de distintos pacientes. Consta de 48 casos y su antigüedad ha sido estimada en 3.000-2.500 a.C. Se desconoce la identidad de su autor original.

Nivel de la lesión y funciones afectadas

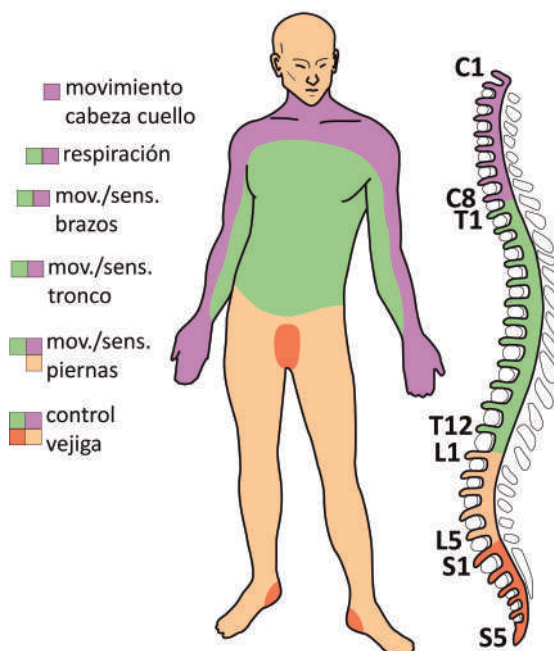


Figura I.2. Déficits funcionales de la lesión medular. El nivel de la lesión medular determina las funciones afectadas. La figura muestra: a la derecha, los segmentos de la médula espinal (C=cervicales, T=torácicos, L=lumbares; S=sacros); en el centro, las áreas controladas por cada región específica; y, a la izquierda, las funciones representativas que se ven afectadas por una lesión en un nivel dado (todas las inferiores a dicho nivel).

en la Figura I.2, los déficits funcionales consecuencia de una LME dependen de la zona en la que se produce la lesión. Así, si la LME se produce en la zona cervical, es habitual la pérdida de la movilidad y sensibilidad en las extremidades superiores e inferiores –tetraplegia–, pudiendo ser necesaria la utilización de respiración artificial para mantener vivo al paciente. Por el contrario, si las lesiones se producen en la zona torácica y lumbar, la pérdida funcional y sensorial suele estar restringida a la parte inferior del cuerpo –paraplegia–. Desafortunadamente, las lesiones altas, que afectan a segmentos cervicales o torácicos, son mayoritarias, representando un 75% del total (McLeod, 2004). Además del nivel de la lesión, los déficits funcionales resultantes de la lesión dependen de otros muchos factores. Entre ellos, quizás el más importante es la severidad del trauma, que en gran medida determina si se produce una pérdida funcional total por debajo de la lesión (lesión completa) o si se preservarán parte de las funciones (lesiones incompletas).

La lesión medular es una de las causas principales de discapacidad permanente en los países desarrollados con un impacto dramático sobre el bienestar físico y psicológico del paciente. La incidencia de las lesiones de origen traumático se aproxima a los 23 nuevos casos por millón de habitantes a nivel mundial (estimaciones para 2007), aunque con notables diferencias entre regiones (Lee *et al.*, 2013). Si bien esta patología tiene una incidencia relativamente baja comparada con otras patologías traumáticas y neurodegenerativas, conlleva una enorme carga social y un elevado coste para los sistemas de salud (entre 0,34 y 1,1 millones de dólares por paciente durante el primer año de lesión y entre 1,1 y 4,7 millones de dólares a lo largo de toda su vida según las estimaciones del centro de estadísticas sobre lesión medular de Estados Unidos de América ([www.nscisc.uab.edu/Public/Facts 2016.pdf](http://www.nscisc.uab.edu/Public/Facts%2016.pdf)). A pesar de que, actualmente, las personas que padecen una LME pueden tener una vida relativamente independiente, hasta el momento no existe ningún tratamiento aceptado por las agencias médicas responsables que sea capaz de reparar los daños causados por la lesión (Beattie *et al.*, 2002).

FISIOPATOLOGÍA DE LA LME

El desarrollo de terapias depende de forma fundamental del estudio de la fisiopatología de la enfermedad, ya que permite identificar potenciales dianas sobre las que desarrollar estrategias terapéuticas, establecer ventanas espacio-temporales óptimas para cada actuación o determinar marcadores que proporcionen información relevante sobre la historia natural de dicha patología. Como establece la OMS, la LME puede tener origen traumático –accidentes de tráfico, agresiones, caídas, mala praxis deportiva– o no traumático –mielopatías compresivas, inflamatorias, infecciosas, etc.–. Dada su mayor incidencia, a lo largo de esta tesis nos centraremos en la lesión medular de tipo traumático, considerando como tales aquellas lesiones derivadas de la contusión, compresión, sección y/o laceración traumática de la médula espinal.

En la fisiopatología de la LME traumática se pueden distinguir 3 fases: fase aguda (o primaria), fase subaguda (o secundaria) y fase crónica (Figura I.3). En la descripción de estas fases seguiremos una secuencia temporal que facilite la comprensión de los procesos y eventos que tienen lugar tras el trauma medular, aunque en muchos casos estos eventos ocurran de manera simultánea (Chacón & Nieto-sampedro, 2005).

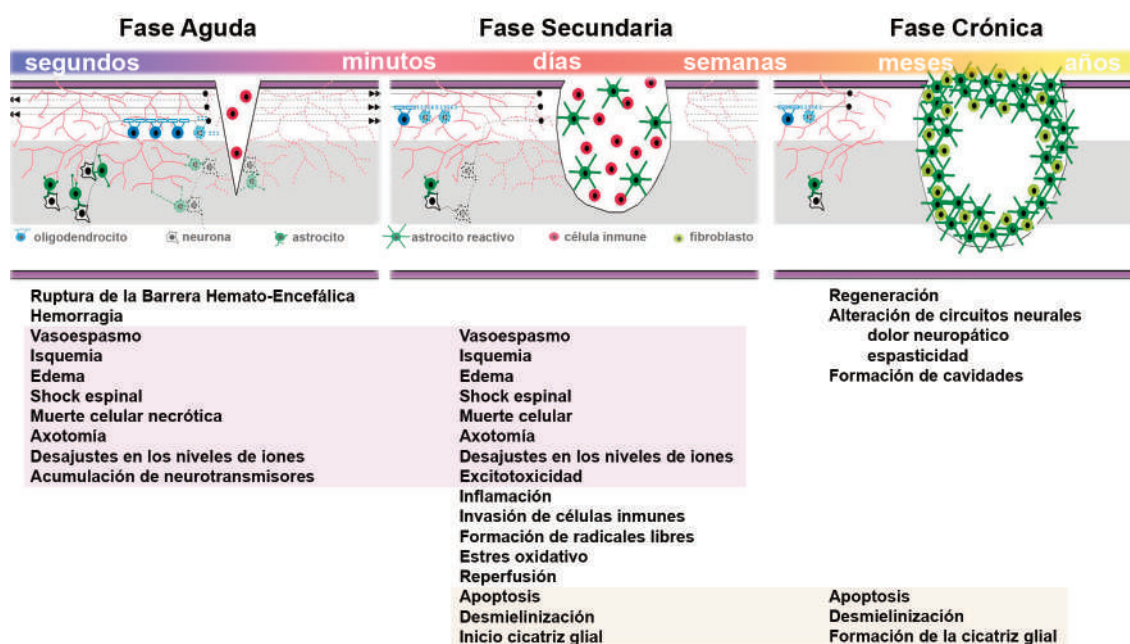


Figura I.3. Fases de la lesión medular traumática. La figura ilustra un resumen esquemático de la progresión medular con el tiempo, detallando sus fases (arriba) y los principales procesos implicados (abajo).

Fases de la LME: fase primaria

La fase primaria o fase aguda abarca los primeros momentos tras la lesión e incluye los procesos de destrucción local de tejido neural causada directamente por el trauma mecánico (Profyris *et al.*, 2004). En las lesiones traumáticas, las fuerzas mecánicas inducidas por la compresión, el estiramiento, la laceración o la transección de la médula espinal causan tensiones y finalmente la ruptura de las membranas plasmáticas. Como consecuencia se produce la muerte necrótica¹ de células neurales y endoteliales, la destrucción de estructuras vasculares y la presencia de hemorragias (petequias) sobre todo en la sustancia gris (Tator, 1995) (Figura I.4). Las neuronas supervivientes en la zona de lesión responden disparando potenciales de acción y liberando iones que, junto con los liberados tras la ruptura de las membranas celulares, causan una profunda alteración de su concentración local e inducirán procesos de excitotoxicidad en neuronas y glía. Por su parte, la muerte de células endoteliales y las demás alteraciones vasculares provocan la ruptura de la barrera hematoencefálica y causan edema e inflamación, así como una respuesta que toma la forma de vasoespasmo y trombosis causando isquemia e hipoxia. La ruptura de las membranas también afecta a la integridad de los axones, causando procesos de axotomía. Inicialmente, estos procesos son más marcados en la sustancia gris y menos en la sustancia blanca, sobre todo en regiones más próximas a la piamadre, en parte debido a las propiedades físicas de la sustancia gris pero también a su mayor vascularización y sus mayores requerimientos metabólicos (Profyris *et al.*, 2004). Durante las primeras 24 horas se produce también el denominado shock espinal, una pérdida de los reflejos medulares por debajo de la zona de lesión que se van recuperando gradualmente con posterioridad (Ditunno *et al.*, 2004).

¹**Muerte necrótica:** muerte celular pasiva y accidental debida a perturbaciones en el ambiente y que produce la liberación incontrolada de contenidos celulares inflamatorios (Fink *et al.*, 2005).

Fases de la LME: fase secundaria

Todas las alteraciones celulares y vasculares inducidas por el trauma junto con la liberación de multitud de moléculas señalizadoras durante la fase aguda transforman el entorno celular de la médula espinal, desencadenando oleadas de muerte secundaria y otros procesos en lo que se reconoce como fase subaguda, daño secundario o fase secundaria. En esta fase secundaria es donde cambia drásticamente el escenario y el pronóstico de la LME.

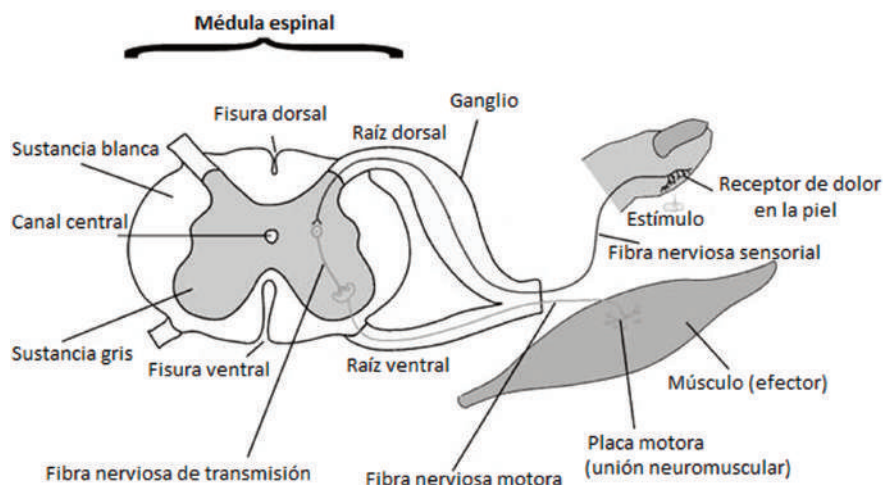


Figura 1.4. Estructura de la médula espinal. La imagen muestra grosso modo la estructura de la médula espinal así como las rutas del proceso sensitivo (músculo-cerebro) a través de la región dorsal y del proceso efector (cerebro-músculo) a través de la región ventral. Imagen modificada de L. Decker.

Tisularmente, la fase subaguda o secundaria muestra inicialmente una importante expansión de la hemorragia en la región medular dañada (Tator, 1995). Aproximadamente a las 6h, el edema afecta a la sustancia blanca (Guth *et al.*, 1999) y en el primer día, se hace difícil la distinción histológica entre sustancia gris y sustancia blanca. Durante la primera semana después de la lesión, el edema se mantiene patente y, además, se conforman las zonas de penumbra isquémica en las que se seguirá produciendo la muerte neuronal secundaria y se formarán cavidades y quistes durante la fase crónica.

A nivel celular y molecular, el abanico de procesos que tienen lugar durante la fase secundaria de una LME es bastante amplio y afecta a los sistemas neural, vascular e inmune. En esta fase, se siguen produciendo procesos necróticos en sentido rostral y caudal a la zona de lesión (epicentro) que pueden llegar a afectar dos segmentos medulares en ambos sentidos. Esta segunda oleada de muerte necrótica afecta principalmente a neuronas, favorecida por el infarto tisular inducido por eventos iniciados en la fase aguda, como el vasoespismo, la trombosis o el shock neurogénico, que reducen el flujo sanguíneo provocando la falta del suministro necesario de oxígeno y nutrientes (hipoxia e isquemia). En respuesta a estos procesos, en los días siguientes se produce la reperusión del tejido lo cual, lejos de limitar los procesos necróticos causados por el infarto, provoca un aumento considerable del daño en la médula. Al modificar un ambiente hipóxico con la exposición nuevamente de oxígeno, se produce un aumento considerable de las especies reactivas de oxígeno (ROS), creando un potente estímulo de muerte celular. Las ROS inducen daño en el SNC por modificación de lípidos –peroxidación lipídica y ruptura de membranas–, proteínas –fragmentación proteica– y ácidos nucleicos –producción de hebras simples–.

Paralelamente a las alteraciones vasculares, en la fase secundaria también continúan los desajustes en los niveles iónicos y la acumulación de neurotransmisores excitatorios –fundamentalmente

glutamato pero también otros como ATP— iniciados durante la fase primaria (Oyinbo, 2011; Profyris *et al.*, 2004). La presencia masiva de neurotransmisores en el espacio extracelular es responsable del proceso de excitotoxicidad, por el cual estos neurotransmisores inducen la activación excesiva y/o prolongada de sus receptores ionotrópicos y la consecuente desregulación de la homeostasis del calcio intracelular (Olney, 1969). A consecuencia de este desequilibrio se producen fallos en el funcionamiento de las mitocondrias, estrés oxidativo y estrés del retículo, que finalmente conducen a la activación de las vías de apoptosis y la muerte neuronal (Epstein *et al.*, 1994). Además de sobre las neuronas, la excitotoxicidad también repercute en otras poblaciones celulares, particularmente en los oligodendrocitos que son especialmente sensibles a la movilidad de calcio debido a su incapacidad para tamponarlo.

La muerte celular resultante de la excitotoxicidad, las alteraciones vasculares o directamente los procesos necróticos desencadenados durante la fase aguda hacen que, en la médula espinal dañada, se liberen una gran cantidad de moléculas señalizadoras —citoquinas— que regulan la respuesta inflamatoria. La liberación de señales pro-inflamatorias junto con la alteración de la barrera hematoencefálica promueven la infiltración de células inmunes —particularmente neutrófilos, monocitos y linfocitos T— que, junto con los macrófagos derivados de la microglía residente, conforman la respuesta inmune a la lesión medular (Trivedi *et al.*, 2007). Como muestra la Figura I.5, los neutrófilos son los primeros leucocitos en migrar al sitio de lesión (Jones *et al.*, 2005), con un máximo durante las primeras 24 horas en ratas y entre 24-72 horas en humanos (Fleming *et al.*, 2006). Estos fagocitos se encargan de eliminar el débris —favoreciendo la viabilidad de células adyacentes— y de “esterilizar” el área dañada mediante la secreción de enzimas proteolíticas y oxidativas que, desafortunadamente, también atacan al tejido remanente tras la lesión (Taoka *et al.*, 1997). Los neutrófilos además secretan citoquinas para el reclutamiento de linfocitos y macrófagos. Por su parte, los macrófagos son las células inmunes más abundantes en la médula dañada, con máximos durante los primeros días tras la lesión (Beck *et al.*, 2010). Estas células inmunes pueden provenir de la diferenciación de monocitos sanguíneos infiltrados tras la lesión o bien de la propia microglía del SNC. Independientemente de su origen, los macrófagos contribuyen a eliminar el débris y las células muertas (incluyendo a los neutrófilos infiltrados en los primeros días) aunque también

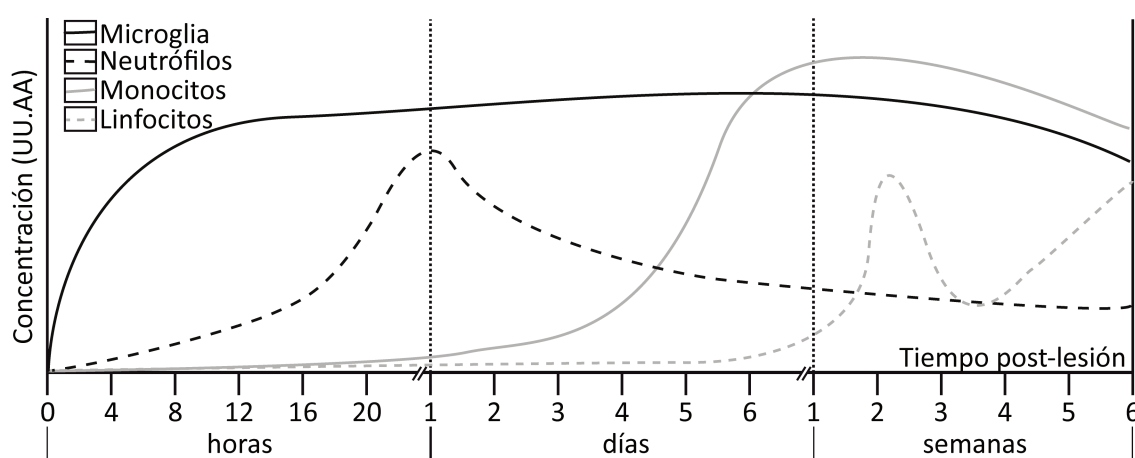


Figura I.5. Evolución temporal de la respuesta inmune tras la lesión medular. Las líneas representan la infiltración de células inmunes en la médula espinal tras el trauma (en ratones). Modificado de Donnelly & Popovich (2008).

aumentan la respuesta inflamatoria liberando citoquinas pro-inflamatorias, ROS, óxido nítrico, proteasas y otras enzimas capaces de agravar el daño secundario (Fleming *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2000). Sin embargo, no todos los macrófagos tienen carácter pro-inflamatorio (macrófagos M1), sino que también existen macrófagos que disminuyen la inflamación y favorecen los procesos regenerativos (macrófagos M2) (Kigerl *et al.*, 2009). Por último, los linfocitos comienzan a infiltrarse en la médula a diferentes tiempos, dependiendo de la especie y la cepa analizada (Sroga *et al.*, 2003), aunque habitualmente se produce a partir de la primera semana tras la lesión (Beck *et al.*, 2010) y su papel en la lesión medular es controvertido (Fleming *et al.*, 2006).

La excitotoxicidad, junto con la formación de ROS y los procesos inflamatorios son responsables de la activación de la apoptosis en los primeros días tras la lesión. Así, la presentación de citoquinas por parte de las células inmunes activa la vía extrínseca de la apoptosis en las células neurales a través de receptores de muerte, fundamentalmente TNFR y Fas. Por su parte, tanto los desequilibrios iónicos como la formación de ROS alteran la membrana mitocondrial, liberando citocromo-c y activando la vía intrínseca de la apoptosis. Los procesos de muerte celular programada tiene lugar principalmente en dos fases: una fase temprana (primeras 24 horas) en la que acompaña a la necrosis en la muerte de distintos tipos celulares en la zona de lesión y una fase tardía (con un máximo alrededor de los 7dpo pero que puede extenderse durante semanas), que afecta mayormente a oligodendrocitos y microglía en la sustancia blanca (Beattie, 2000). Éste es uno de los eventos más relevantes de la fase secundaria, ya que la pérdida progresiva de células causada por la apoptosis incrementa los daños tisulares y agrava los déficits funcionales resultantes de la lesión medular. No en balde, el desarrollo de tratamientos citoprotectores capaces de reducir las pérdidas celulares tras la lesión medular es uno de los principales objetivos de las investigaciones básicas y clínicas en el tratamiento para la lesión medular.

Otro de los procesos que tiene lugar en esta fase secundaria es la degeneración Walleriana mediante la cual se produce la degeneración de los axones separados del soma debido al trauma inicial. La degeneración Walleriana puede durar meses en roedores o años en el caso de humanos (David & Ousman, 2002), ocurre tanto en tractos ascendentes (sensoriales) como descendentes (motores) y su presencia suele estar altamente relacionada con zonas de apoptosis retrasada (Quencer, 2002). Cabe destacar que, además, esta pérdida axonal tiene repercusión directa sobre la supervivencia de los oligodendrocitos ya que éstos reciben soporte trófico de los axones (Warden *et al.*, 2001). La pérdida de este tipo celular afecta a su vez a la capacidad de transmisión de los axones ya que los oligodendrocitos son los encargados de la mielinización de los axones, lo que da lugar a un ciclo que se retroalimenta contribuyendo de forma fundamental a los déficits funcionales resultantes de la lesión medular.

Fases de la LME: fase crónica

En la fase crónica continúan produciéndose y estabilizándose procesos como la apoptosis o la degeneración Walleriana. Sin embargo, el proceso más característico de esta fase es la formación de la cicatriz glial. Los procesos inflamatorios inducidos por la LME inician la gliosis reactiva, por la que células microgliales y astrocitos cambian su estado (se activan) para, entre múltiples funciones, contribuir en la limpieza del debrís celular (macrófagos derivados de la microglía) y restaurar la glía limitans. En este último proceso se unen células no neurales, particularmente de linaje fibroblástico,

junto con astrocitos reactivos, pericitos, precursores gliales, etc para dar lugar a una cicatriz que termina por aislar la zona dañada creando una barrera física que la separa de la zona medular no afectada. Este aislamiento ayuda a la prevención de la propagación del daño tisular, pero también limita los procesos regenerativos debido a la secreción de moléculas inhibitorias del crecimiento axonal (Fawcett & Asher, 1999) aunque las evidencias obtenidas recientemente por el grupo de Sofroniew (Anderson *et al.*, 2016) indican que el papel de los astrocitos en la inhibición de la regeneración queda lejos de estar claro. Otros fenómenos típicos de la fase crónica de la lesión medular incluyen la aparición cavidades quísticas en el parénquima medular (siringomielia) –cuya generación está asociada a la formación de la cicatriz glial–, y la formación de circuitos aberrantes –que dan lugar a respuestas funcionales anómalas, particularmente en forma de actividad motora involuntaria (espasticidad) y dolor no asociado a causas físicas (dolor neuropático)–.

MODELOS EXPERIMENTALES DE LESIÓN MEDULAR

El empleo de modelos experimentales de lesión medular permite avanzar en el conocimiento sobre los cambios morfológicos, celulares y moleculares que ocurren en cada etapa de la lesión, aportando información fundamental para desarrollar y testar nuevas terapias que posibiliten una recuperación anatómica y funcional (Hodgetts *et al.*, 2009).

Los modelos de lesión medular más comúnmente empleados son los modelos de transección, compresión y contusión medular. La elección de un modelo de lesión medular depende estrechamente del objetivo del estudio y los procesos a evaluar. Así pues, los modelos de transección permiten mimetizar tanto lesiones completas –posibilitando evaluar la efectividad de terapias enfocadas en promover la regeneración axonal– como lesiones incompletas –que, además de la regeneración axonal permiten correlacionar cambios anatómicos con mejoras funcionales y facilita la comparación con el área análoga no dañada–. Los modelos de compresión, bien mediante clip o mediante balón, permiten mimetizar los daños debidos a la compresión de la médula mediante la compresión directa de la médula espinal por tiempos definidos –pudiendo evaluar, entre otros aspectos, la relación entre el tiempo de compresión y la severidad del daño–. No obstante, los modelos de lesión medular por contusión son los más empleados debido a que simulan más fielmente a la mayoría de lesiones medulares traumáticas (Hodgetts *et al.*, 2009; Profyris *et al.*, 2004; Tator, 1995). Como consecuencia se han desarrollado modelos de contusión reproducibles en ratas y ratones que han supuesto un gran avance en los últimos años.

A pesar de que los modelos experimentales de lesión medular suponen una herramienta clave para el estudio de la lesión medular, cabe mencionar que las diferencias entre el sistema nervioso humano y el de los animales empleados en estos modelos supone una gran limitación en muchos aspectos. Entre estas diferencias se incluyen la respuesta inmune, la inflamatoria, la presencia o ausencia de cavidades quísticas o incluso a la extensión del daño secundario. La diferencia de tamaño entre humanos y animales es otra diferencia destacable, que repercute en la distancia requerida para que los axones puedan regenerar tras la lesión (Courtine *et al.*, 2007). Estas diferencias en las respuestas frente a la lesión se reproducen incluso al comparar cepas de una misma especie (Hausmann, 2003; Sroga *et al.*, 2003), por lo que resulta imprescindible tomar precauciones en la extrapolación de los resultados obtenidos con animales a la fisiopatología humana (Profyris *et al.*, 2004).

ABORDAJE ACTUAL EN EL TRATAMIENTO CONTRA LA LME

Como comentamos anteriormente, hasta la fecha no existe ningún tratamiento aceptado por las agencias médicas responsables que sea capaz de reparar los daños causados por la lesión medular (Beattie *et al.*, 2002). No obstante, los recientes avances en ciencia y tecnología han permitido incrementar la tasa de supervivencia, así como las oportunidades de vivir de manera independiente y una larga esperanza de vida, algo difícil de imaginar pocas décadas atrás. Estos avances implican mejoras tanto desde la atención primaria en el escenario donde se produce el trauma (lesión aguda) como en relación a las complicaciones derivadas del mismo.

En el pasado, hasta un 25% de las lesiones medulares se producían tras el trauma inicial debido al transporte del paciente o durante la evaluación de los daños. Las mejoras en la atención médica primaria, incluyendo la inmovilización del paciente en los primeros momentos tras la lesión, han permitido reducir notablemente los ratios de mortalidad, la severidad del daño y otras complicaciones adicionales (Hachen, 1974; Tator *et al.*, 1993). El desarrollo de estrategias enfocadas a prevenir o paliar las complicaciones derivadas del trauma también ha contribuido de manera notable a mejorar en el pronóstico de la lesión medular. Estas estrategias incluyen la prevención del dolor crónico, el alivio de la espasticidad o el tratamiento de las úlceras por presión, de la disfunción de la vejiga, de la disfunción sexual, de la fertilidad o de la depresión, entre otros procesos habituales tras la lesión medular.

En las últimas décadas se han llevado a cabo ensayos clínicos con potenciales terapias para tratar la lesión medular (v.g.: el tratamiento con metilprednisolona, con el gangliósido GM-1 o con naloxona). Sin embargo, ninguna de ellas tiene la aprobación para ser implementada como estándar rutinario en el tratamiento de la lesión medular (Fehlings & Spine Focus Panel, 2001). Aunque la administración de altas dosis de metilprednisolona durante las primeras horas tras la lesión si se incorporó a la práctica clínica a raíz de los ensayos NASCIS II de los años 90 del pasado siglo (Bracken *et al.*, 1990), desde principios del presente siglo su conveniencia ha sido bastante controvertida dado que los resultados de los ensayos clínicos son poco concluyentes y los efectos beneficiosos del tratamiento parecen ser muy limitados –incluso se ha señalado que pueda ser únicamente mejoras azarosas– y no compensan los efectos secundarios resultantes (Hurlbert, 2000). También se han valorado otro tipo de terapias como el transplante de células de la glía envolvente del bulbo olfativo o de macrófagos autólogos, el implante de biomateriales con diferentes propiedades, las terapias génicas empleando vectores virales o modificando ex vivo células de Schwann o fibroblastos para liberar factores neurotróficos o los tratamientos con fármacos como Riluzole, minociclina o ciclosporina-A, o incluso las aproximaciones basadas en la estimulación eléctrica o las conocidas interfaces cerebro-ordenador, entre otros. La ausencia de resultados suficientemente satisfactorios en el tratamiento de la lesión medular señala la necesidad de continuar evaluando nuevas aproximaciones terapéuticas.

Actualmente, se continúa investigando diferentes estrategias enfocadas a controlar y/o modificar procesos clave que tienen lugar tras la lesión medular como la isquemia, la entrada de calcio, la formación de radicales libres, la respuesta inflamatoria, el aporte trófico, el crecimiento axonal o las barreras fisicoquímicas que imposibilitan el crecimiento axonal, entre otros procesos. Uno de los aspectos más característicos y determinantes de la fase secundaria es la muerte celular por

apoptosis, la cual induce la pérdida tisular incrementando los déficits funcionales originados por el trauma inicial. Como consecuencia, el desarrollo de terapias neuroprotectoras, destinadas a prevenir o minimizar la apoptosis en las células neurales tras la lesión medular, es considerada una de las aproximaciones fundamentales en el campo (Liverman *et al.*, 2005), primordial para favorecer la reparación espontánea o terapéutica de los daños y reducir los déficits funcionales resultantes. Los estudios en modelos animales han permitido caracterizar numerosos mecanismos y vías moleculares implicados en los procesos de apoptosis que ocurren tras la LME y, sobre esta base, identificar potenciales dianas terapéuticas, tanto en forma de moléculas (*v.g.*: enzimas clave como caspasas o calpaína, o receptores de glutamato) como de procesos (*v.g.*: liberación de citocromo c) que resultan clave en la activación o ejecución de la vía apoptótica.

ESFINGOLÍPIDOS

Actualmente resulta difícil encontrar un área de la biología celular en la que los lípidos no jueguen un papel importante, sino clave, como moléculas reguladoras o de señalización (Hannun & Obeid, 2008). Dentro de estas biomoléculas, investigaciones en diversos campos han puesto de manifiesto la importancia que tienen los diversos miembros de la familia de los esfingolípidos, tanto en condiciones fisiológicas como en un amplio espectro de enfermedades.

ESTRUCTURA DE LOS ESFINGOLÍPIDOS

Los esfingolípidos son un gran grupo de lípidos complejos derivados de un esqueleto común constituido por un aminoalcohol de 18 carbonos y denominado base esfingoide (Figura I.6). Las distintas bases esfingoides son:

Esfingosina: aminoalcohol de 18 carbonos con una insaturación (d18:1) entre el C4 y el C5. Esta molécula supone el esqueleto común de la mayoría de los esfingolípidos en mamíferos (Figura I.6.A).

Dihidroesfingosina (esfinganina): análogo estructural a la esfingosina pero carente de insaturaciones (d18:0). Constituye el esqueleto de algunos tipos de esfingolípidos aunque su abundancia es menor que en el caso anterior.

Fitoesfingosina (4-hidroxi-esfinganina): análogo a la esfingosina pero con un sustituyente hidroxilo (–OH) en el C4.

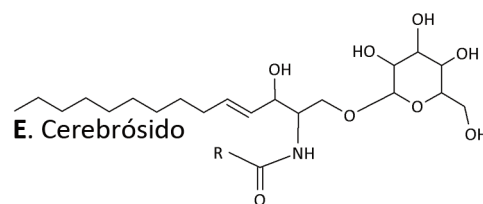
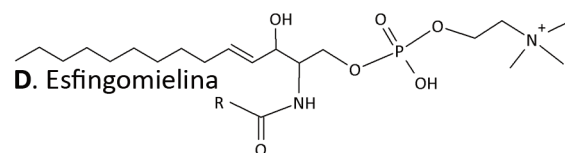
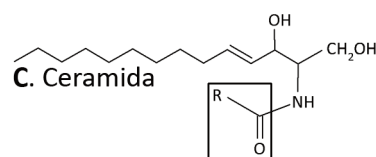
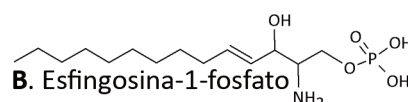
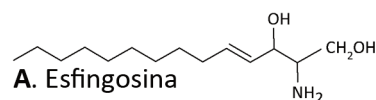


Figura I.6. Estructura molecular de los esfingolípidos. En la figura se muestra la estructura molecular de los principales grupos de esfingolípidos considerados en esta tesis. El recuadro en la estructura de ceramida identifica el grupo acilo. R= grupo sustituyente.

La presente tesis se centrará en el estudio de los esfingolípidos con las bases esfingoides Sph y dhSph. Las familias de esfingolípidos basados en esta base esfingoide son características de plantas y su presencia en mamíferos se produce únicamente como producto intermedio en la conversión entre algunas familias, por lo que no se han tenido en cuenta en los estudios detallados más adelante.

La modificación de las bases esfingoides con distintos sustituyentes da lugar al amplio abanico de esfingolípidos existentes. Una de las modificaciones posibles es la fosforilación del grupo –OH del C1 de las diferentes bases esfingoides. Entre los esfingolípidos resultantes, los más relevantes son:

Esfingosina-1-fosfato: forma fosforilada de la esfingosina (S1P, Figura I.6.B). La S1P es un lípido bioactivo con numerosas funciones de señalización y el sujeto principal de los estudios de esta tesis.

Dihidroesfingosina-1-fosfato (esfinganina-1-fosfato): forma fosforilada de la esfinganina.

Además de la fosforilación, las bases esfingoides pueden ser N-aciladas con ácidos grasos de diferente longitud e insaturación, lo que da lugar a una amplia variedad de especies. Las principales son:

Ceramidas: familia² de esfingolípidos formados a partir de la N-acilación de la esfingosina con ácidos grasos que suelen ser de cadena larga (≥ 16 carbonos) y, generalmente, saturados o monoinsaturados (Figura I.6.C).

Dihidroceramidas: familias análogas a las ceramidas pero cuya base esfingoide es la dihidroesfingosina.

Debido al elevado número de ácidos grasos que pueden dar lugar a las ceramidas, éstas suelen ser referidas en función a la naturaleza del grupo acilo. Así, por ejemplo, la ceramida sintetizada mediante la N-acilación de la esfingosina con ácido oleico (ácido graso de 18 carbonos con 1 insaturación) se denomina como Ceramida C18:1 o Cer18:1 (esta última será la nomenclatura empleada en esta tesis). También es posible encontrar una nomenclatura ligeramente distinta en otros textos, *v.g.*: Ceramida (d18:1/16:0), donde la parte izquierda del paréntesis señala la naturaleza de la base esfingoide (d18:1 refiere a la esfingosina) y la parte derecha a la naturaleza del ácido graso sustituyente (16:0, indica 16 carbonos y 0 insaturaciones).

Las ceramidas suponen el nodo central en la síntesis de esfingolípidos más complejos debido, fundamentalmente, a la elevada diversidad de modificaciones que pueden experimentar (ver Figura I.7). Así pues, dependiendo de los sustituyentes implicados en estas modificaciones se identifican los siguientes esfingolípidos:

Ceramidas-1-fosfato: familia de esfingolípidos sintetizados mediante la fosforilación en el C1 de la ceramida. Se reconocen numerosas especies dependiendo de la naturaleza del grupo acilo de la ceramida modificada.

Esfingomielinas: familia de esfingolípidos formados por la incorporación de una molécula de

²**Familia**: conjunto de especies de esfingolípidos que difieren únicamente en la longitud del ácido graso sustituyente.

acetilcolina o de fosfoetanolamina a las ceramidas. De forma análoga, las dihidroesfingomielinas se forman por una modificación idéntica pero de las dihidroceramidas (Figura I.6.D).

Glicoesfingolípidos: conjunto de familias de esfingolípidos formados por la unión de oligosacáridos a las ceramidas. Se diferencian según el número y tipo de moléculas que actúen como sustituyente, pudiendo distinguirse:

Cerebrósidos (GluCer): familias de esfingolípidos que contienen un monosacárido como sustituyente en el grupo –OH del C1 de la ceramida (Figura I.6.E). Según el monosacárido sustituyente se distinguen en:

Glucosílceraidas: el azúcar sustituyente es una glucosa.

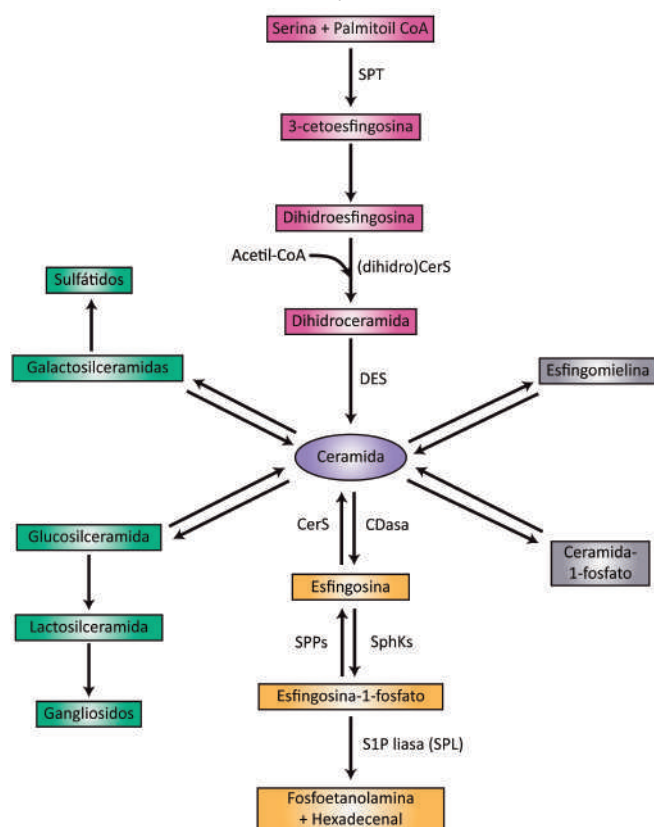
Galactosílceraidas: el azúcar sustituyente es una galactosa.

Globósidos: familia de esfingolípidos derivados de la ceramida por unión con oligosacáridos. En el caso particular de las lactosílceraidas (LacCer), estudiadas en la presente tesis, el sustituyente es el disacárido lactosa (glucosa + galactosa).

Gangliósidos: gran grupo de especies derivadas de ceramidas sustituidas con varios residuos de azúcar y una o más unidades de ácido N-acetilneuramínico (también llamado ácido siálico). Son los esfingolípidos más complejos y, en muchas ocasiones, se consideran como un grupo en sí mismo, diferente de los esfingolípidos. Este tipo de glicolípidos no han sido analizados en la presente tesis.

METABOLISMO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS

A pesar de la diversidad de esfingolípidos existentes, la síntesis de todos ellos está gobernada por una vía metabólica común que se inicia con la síntesis *de novo* a partir de dos precursores sencillos:



la serina y el palmitoil coenzima A (ver revisión detallada en Gault *et al.*, 2010). Como se muestra en la Figura I.7, estos dos compuestos se condensan por la acción de transferasas y reductasas para dar lugar a la dihidroesfingosina (dhSph), que posteriormente es N-acilada mediante la enzima Ceramida Sintasa (CerS) para dar lugar a las distintas dihidroceramidas (dhCer).

Figura I.7. Metabolismo de los esfingolípidos. La imagen ilustra las diferentes familias de esfingolípidos así como las enzimas que participan en las diferentes conversiones.

³**Ceramida Sintasa (CerS):** En mamíferos existen 6 isoformas (CerS1-6) de la enzima con distintas preferencias por la longitud de los ácidos grasos.

Las dhCer pueden ser desaturadas mediante desaturasas para dar lugar a las ceramidas. Estas últimas son el nodo central en la síntesis y el reciclado de las formas más complejas que se derivan de ellas, así como de la vía degradativa de los esfingolípidos para dar lugar a trans-2-hexadecenal y fosfoetanolamina. Sorprendentemente, hasta la fecha no se ha descrito ninguna enzima que permita la reconversión de ceramidas a dhCer, por lo que la conversión de dhCer a Cer supone un proceso irreversible.

En la síntesis de esfingolípidos complejos, las ceramidas son sustituidas con fosfocolina o fosfoetanolamina y convertidas a esfingomielinas mediante esfingomielina sintasas. Alternativamente, también pueden ser glicosiladas mediante la acción de glucosilceramida transferasas para dar lugar a una enorme variedad de especies glicosiladas o puede ser fosforilada mediante la ceramida quinasa para dar lugar a la ceramida-1-fosfato. Como hemos comentado anteriormente, estas transformaciones son reversibles por lo que, mediante las enzimas específicas correspondientes, las esfingomielinas, glicosílceramidas o ceramidas-1-fosfato pueden ser degradadas a ceramidas. Esta vía degradativa continúa con la eliminación del sustituyente N-acilado de las ceramidas y dihidroceramidas, dando lugar a las bases esfingoides. En el caso de las dhCer, la acción de las desaturasas da lugar a la síntesis de dhSph mientras que, en el caso de las Cer, estas

desaturadas dan lugar a la generación de Sph. La Sph resultante puede ser N-acilada a través de diversas CerS para dar lugar, nuevamente, a distintas especies de ceramidas en una vía de reciclaje conocida como *Salvage Pathway*. Alternativamente, la esfingosina puede ser fosforilada mediante quinasas específicas para dar lugar a esfingosina-1-fosfato, que constituye el último esfingolípido en la ruta de degradación irreversible de los esfingolípidos. Más adelante, en los apartados específicos correspondientes, se detallan el metabolismo y función de esta molécula así como información relevante sobre la enzima encargada de su degradación irreversible, la esfingosina-1-fosfato liasa.

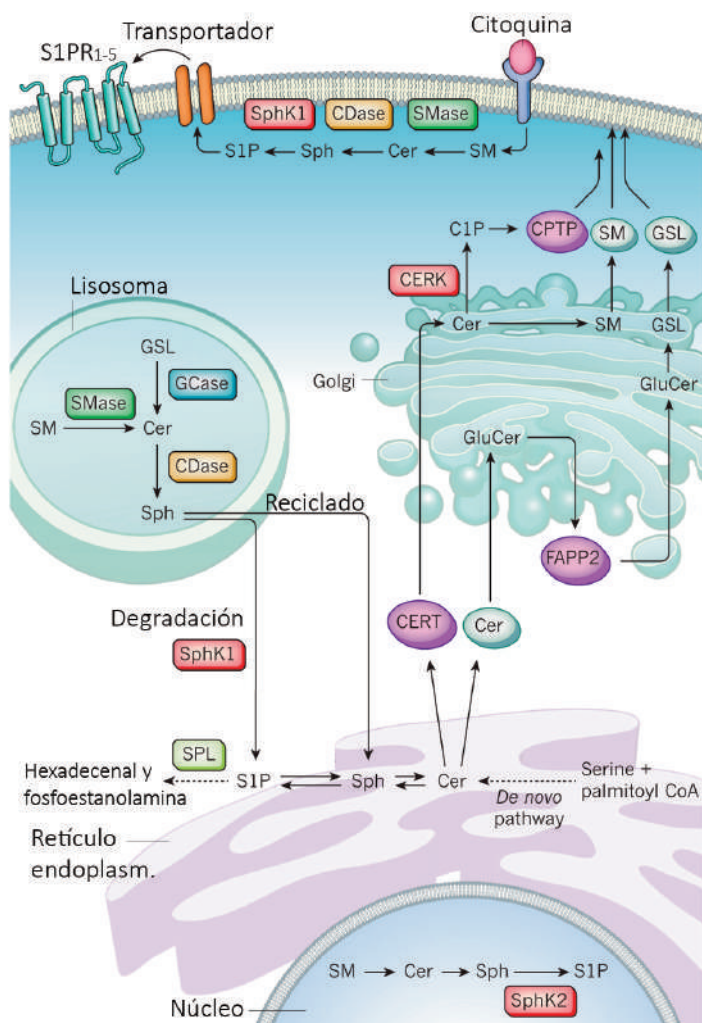


Figura 1.8. Localización intracelular del metabolismo de los esfingolípidos. La figura muestra los orgánulos donde principalmente tienen lugar los procesos de síntesis y degradación de los diferentes esfingolípidos. Modificado de Maceyka & Spiegel, 2014.

Como se ilustra en la Figura I.8, todos los procesos del metabolismo de los esfingolípidos tienen lugar en orgánulos y membranas celulares específicas, desde la membrana del retículo endoplasmático donde se produce la síntesis *de novo* (aunque posiblemente también en otras membranas relacionadas, como la membrana perinuclear y las mitocondriales; Hannun y Obeid, 2008) y la degradación final de la S1P, hasta el aparato de Golgi donde se produce la síntesis de formas más complejas como esfingomielina y glucosilceramidas o el lisosoma o la membrana plasmática donde se producen varios de los procesos degradativos.

FUNCIONES DE LOS ESFINGOLÍPIDOS

A finales del siglo XIX Johann L.W. Thudichum describió por primera vez los compuestos entre los que se encontraban esfingomielinas, cerebrósidos y otros glicolípidos. Thudichum observó que la hidrólisis de estos compuestos daba lugar a una especie de tipo alcaloide a la que nombró como esfingosina en conmemoración a la esfinge, la cual representaba los muchos enigmas que le suponía esta especie. Durante décadas, la función de los esfingolípidos, como la de la mayoría de lípidos, se consideró fundamentalmente estructural. Sin embargo, esta apreciación ha cambiado radicalmente en las últimas décadas y actualmente ha quedado patente que, además de sus funciones estructurales, los esfingolípidos tienen numerosos papeles en señalización y regulación, asumiéndose que todos ellos son bioactivos⁴ a menos que se pruebe lo contrario (Hannun & Obeid, 2008). Aunque enumerar todas las funciones descritas de los esfingolípidos queda fuera de los objetivos de esta revisión (para una revisión más exhaustiva ver, por ejemplo, Merrill *et al.*, 1997), algunas de las más importantes que llevan a cabo las diferentes especies se resumen en los siguientes párrafos.

Las formas más complejas, incluyendo las esfingomielinas y varios de los glucoesfingolípidos, están entre los principales componentes estructurales de la membrana plasmática, siendo particularmente abundantes de la vaina de mielina (Gault *et al.*, 2010). Además, varios de ellos forman parte de los microdominios lipídicos de la membrana plasmática conocidos como *lipid rafts* (Fyrist & Saba, 2010). Las esfingomielinas y otros esfingolípidos complejos como los cerebrósidos también tienen una importante función señalizadora en procesos de crecimiento celular, apoptosis, así como en adhesión y comunicación celular (Kolesnick, 1994) o incluso en la resistencia de agentes quimioterapéuticos (Hannun & Obeid, 2008). Además, varios de estos esfingolípidos participan en la formación y estabilización de las ramificaciones axonales (Merrill *et al.*, 1997 y referencias incluidas).

El otro gran grupo de esfingolípidos, las ceramidas, forma parte en varias de las vías de señalización más importantes en la biología celular, a través, por ejemplo, de la activación de MAP quinasas o de la regulación de c-myc y otros factores de transcripción (Merrill *et al.*, 1997). Su contribución en estas vías les permite regular numerosas funciones, incluyendo las respuestas a estrés, la diferenciación celular, el arresto del ciclo celular, la senescencia o la apoptosis (Kravka & Hannun, 2009). Su forma fosforilada, la ceramida-1-fosfato, también tiene papeles importantes en señalización, actuando como activador de la fosfolipasa A2 y como regulador del tráfico de vesículas, la fagocitosis o la mitogénesis (Hannun & Obeid, 2008). Por su parte, las formas dihidrogenadas de las ceramidas, las dihidroceramidas, aunque han sido consideradas precursores inactivos durante mucho tiempo, también parecen jugar un papel relevante en la regulación de procesos como el ciclo celular o la autofagia (Kravka & Hannun, 2009).

⁴**Lípido bioactivo:** el término hace referencia a que cambios en los niveles del lípido en cuestión redundan en consecuencias funcionales (Hannun & Obeid, 2008).

Finalmente, la esfingosina y su forma fosforilada son, junto con las ceramidas, las formas que más han atraído la atención de los investigadores por sus funciones de regulación y señalización. Su función más conocida está relacionada con la proliferación y la apoptosis, siendo la esfingosina (Sph) un factor pro-apoptótico (Taha *et al.*, 2006) mientras que su forma fosfatada, la S1P, es anti-apoptótica y proliferativa. La S1P tiene además importantes implicaciones en diversos procesos celulares, como la adhesión, la migración, así como en angiogénesis e inflamación (Kravetska & Hannun, 2009; Spiegel & Milstien, 2003). Varias de estas funciones se describirán detalladamente más adelante, en el apartado específico relativo a S1P.

Es importante destacar que, además del vasto número de procesos celulares en los que participan las especies individuales de esfingolípidos, su interconversión directa a través de la vía metabólica añade una compleja red por posibilidades funcionales adicionales, ya que los cambios en la concentración de una única especie pueden redundar en una cascada de cambios en los niveles de otras muchas especies, con sus correspondientes efectos funcionales (Hannun & Obeid, 2008). Es más, la complejidad funcional aumenta porque, en muchos casos, las funciones de estas moléculas dependen de la localización celular donde se sintetizan, de forma que, por ejemplo, las funciones de la ceramida difieren si se sintetiza en el retículo endoplasmático o si lo hace en la membrana plasmática, o incluso si se sintetiza en la capa interna o externa de la membrana (Hannun & Obeid, 2008). Toda esta complejidad, junto con la falta de desarrollo de las herramientas apropiadas para su análisis, tienen como consecuencia que apenas si hayamos comenzado a conocer las funciones y propiedades de los esfingolípidos y que aspectos clave, como las consecuencias funcionales de la longitud de los ácidos grasos sustituyentes en las ceramidas y los esfingolípidos complejos, permanezcan aun prácticamente ignotos (Gault *et al.*, 2010).

IMPLICACIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN DIVERSAS PATOLOGÍAS

Como cabría esperar, la diversidad de funciones conocidas de los esfingolípidos está asociada a un importante papel en multitud de patologías: desde enfermedades cardíacas (ver por ejemplo, Levade *et al.*, 2001) a enfermedades inflamatorias (ver Nixon, 2009), metabólicas (Cowart, 2008) e incluso nefropatías (ver revisión en Merscher & Fornoni, 2014). De hecho, se ha identificado un grupo de enfermedades de depósito lipídico lisosomal (*lysosomal lipid storage disorders*) asociadas a defectos del metabolismo de los esfingolípidos conocidas como esfingolipidosis (Sandhoff, 2013) y que incluye síndromes como Niemann-Pick o Sandhoff-Jatzkewitz (Figura I.9).

En el sistema nervioso central, los esfingolípidos también juegan papeles fundamentales en muchos procesos patológicos, incluyendo obviamente en las esfingolipidosis (Sandhoff, 2013), pero también en el dolor neuropático (Patti *et al.*, 2012) o incluso en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (Jana & Pahan, 2010). En el ámbito específico de las lesiones del sistema nervioso central, los cambios en los niveles de determinados esfingolípidos han sido relacionados con procesos clave como la reactividad glial (Pannu *et al.*, 2005), la muerte celular y la inflamación (Cuzzocrea *et al.*, 2009), el dolor neuropático (Coste *et al.*, 2008), la excitabilidad neuronal (Chi & Nicol, 2010), la diferenciación celular (Spohr *et al.*, 2012), supervivencia (Qin *et al.*, 2010) y otros procesos (Buccoliero *et al.*, 2002). Es más, aunque no se han analizado directamente en traumatismos del sistema nervioso central, diversos esfingolípidos tienen papeles relevantes en muchos de los procesos que caracterizan la fisiopatología de los traumas del SNC, incluyendo la apoptosis (ver, por

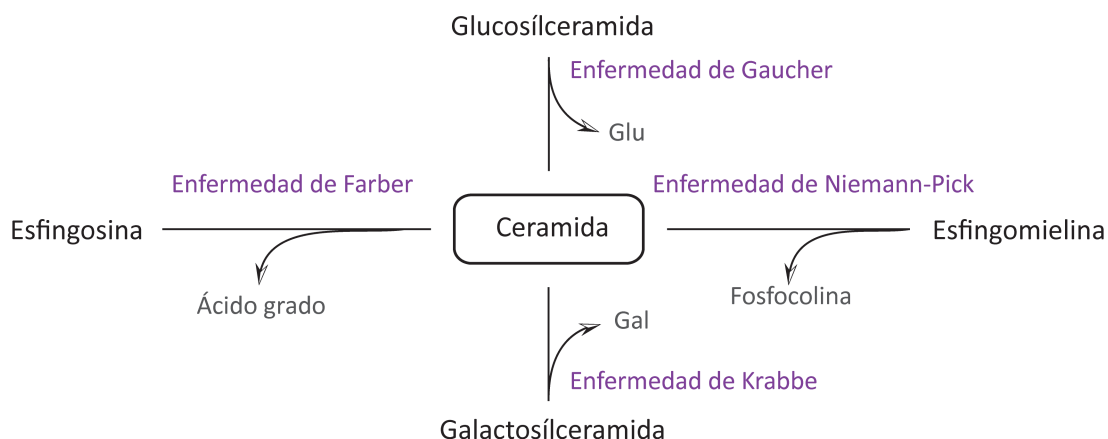


Figura I.9. Patologías asociadas a defectos en el metabolismo de los esfingolípidos. La figura muestra, a modo de ejemplo, algunas de las patologías asociadas a defectos en el metabolismo de distintos esfingolípidos. Modificada de S. Radević (2009).

ejemplo, Obeid *et al.*, 1993), la inflamación (Kitatani *et al.*, 2016), la alteración de la barrera hematoencefálica (Prager *et al.*, 2015) o la mielinización (Zöller *et al.*, 2008), lo cual sugiere que podrían constituir dianas interesantes para nuevas aproximaciones terapéuticas destinadas a la regulación de estos procesos. Desafortunadamente, los mecanismos precisos o incluso de papel de la gran mayoría esfingolípidos o sus cambios tras el trauma medular están aún por explorar.

LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO

La esfingosina-1-fosfato fue descubierta en los años noventa por la Dra. Sarah Spiegel y sus colaboradores (Zhang *et al.*, 1991). Este esfingolípido está presente en la mayoría de las células de todos los organismos eucariotas, siendo particularmente abundante en plaquetas y eritrocitos desde donde se secretan al plasma (Herr & Chun, 2007; Pyne & Pyne, 2000). Debido a sus múltiples funciones y su participación en diversas patologías, la S1P ha suscitado un gran interés por parte de la comunidad científica.

METABOLISMO, TRANSPORTE Y SEÑALIZACIÓN

La síntesis de S1P se produce por la fosforilación de la Sph mediante la enzima esfingosina quinasa (SphK) que cataliza la transferencia del grupo fosfato del ATP al primer hidroxilo de la Sph (Pulkoski-gross *et al.*, 2015). Esta enzima presenta dos isoformas, SphK1 y SphK2, que difieren en su localización subcelular: la SphK1 se encuentra preferentemente en el citosol mientras que la SphK2 lo hace en el núcleo, aunque las dos también han sido detectadas extracelularmente (ver, por ejemplo, Ancellin *et al.*, 2002; Weigert *et al.*, 2010). Ambas enzimas presentan funciones parcialmente redundantes, como demuestra el hecho que los animales transgénicos con deficiencia en una u otra isoforma son viables mientras que el doble transgénico carente de las dos isoformas resulta letal (Mizugishi *et al.*, 2005).

La degradación de S1P se produce de manera irreversible mediante la acción de la enzima esfingosina-1-fosfato liasa (SPL) (Stoffel *et al.*, 1969) para dar lugar a *trans*-2-hexadecenal y fosfoetanolamina como productos de la reacción. Como ya se mencionó anteriormente, la acción de SPL sobre S1P

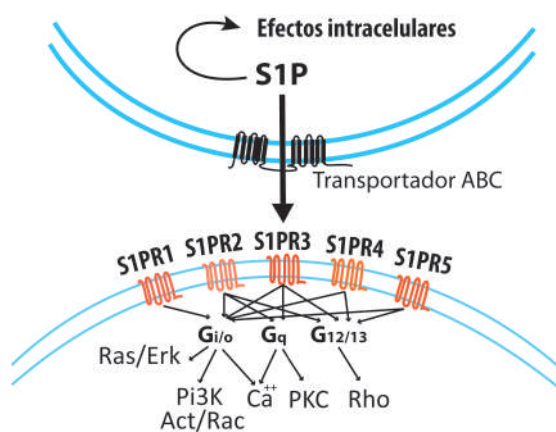
supone el único punto de degradación de los esfingolípidos en su ruta metabólica. Alternativamente a su degradación irreversible, la S1P también puede ser desfosforilada de forma reversible mediante la acción de la fosfatasa específica denominada esfingosina-1-fosfato fosfatasa (SPP), en sus dos isoformas SPP1 y SPP2, o bien mediante enzimas inespecíficas con actividad lípido-fosfohidrolasa (*lipid phosphate phosphohydrolases*; LPPs) (Gault *et al.*, 2010) . En ambos casos, la desfosforilación de la S1P da lugar a la síntesis de Sph, participando en la vía de reciclaje de los esfingolípidos.

Debido a su carácter anfipático, fruto de la combinación de una cadena carbonada hidrofóbica y de un grupo fosfato polar, la S1P presenta una elevada solubilidad, lo que le permite estar presente tanto en las membranas celulares como en el citosol (García-Pacios *et al.*, 2009). La S1P también puede ser secretada al espacio extracelular a través de los transportadores ABBC1 y ABCA1 de la familia de las proteínas ABC (*ATP binding cassette*; Kim *et al.*, 2009) o del transportador específico Spinster2 (Spns2), el cual juega un papel fundamental en la regulación de los niveles de S1P en el plasma y los nódulos linfáticos (Nagahashi *et al.*, 2013). La S1P extracelular también puede ser internalizada mediante los transportadores CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Hannun & Obeid, 2008). Interesantemente, la actividad de estos transportadores se encuentra modulada por la S1P lo que permite atenuar parte de la señalización mediada por este metabolito (Malik *et al.*, 2015).

Dado su carácter anfipático y su presencia tanto en diferentes compartimentos celulares como el espacio extracelular, la S1P es capaz de actuar de manera extracelular e intracelular. Intracelularmente, la S1P es considerada un segundo mensajero (*second messenger*), capaz de unirse a diversas moléculas reguladoras, incluyendo enzimas, canales y factores de transcripción, y regular su actividad (Saba & Hla, 2004). Mediante estos mecanismos, la S1P ha sido implicada en la inducción de la liberación de calcio (Chalfant & Spiegel, 2005), en la regulación de la expresión génica mediante su acción sobre diversas histonas (Hait *et al.*, 2010) y en la regulación de la ruta de los esfingolípidos, siendo uno de los reguladores de la actividad de la CerS2 (Laviad *et al.*, 2008). Adicionalmente, algunos autores proponen otra forma de señalización (señalización “metabólica”) debido a que las rutas de síntesis y degradación de la S1P interseccionan con rutas celulares esenciales, como la síntesis de fosfolípidos o el metabolismo de los esteroides, de forma que los niveles de S1P pueden condicionar decisiones celulares críticas, incluyendo la supervivencia o la diferenciación celular (ver, por ejemplo, Saba & Hla, 2004). Sin embargo, hasta la fecha, la mayor parte de sus funciones intracelulares, de los mecanismos implicados y de las moléculas diana sobre las que actúa están aún por determinar (Strub *et al.*, 2010), razón por la cual continúa siendo sujeto de estudio en numerosas investigaciones.

A diferencia de sus funciones intracelulares, el papel extracelular de la S1P ha sido ampliamente descrito. Diversos estudios (ver revisión en Takabe

Figura I.10. Señalización extracelular mediada por S1P.
La imagen muestra las distintas vías de señalización activadas por cada uno de los cinco receptores específicos de S1P



et al., 2008) han puesto de manifiesto que la S1P secretada actúa como ligando, autocrino o paracrino, de cinco receptores de membrana específicos (S1PR₁₋₅) acoplados a proteína G de la familia Edg (*Endothelial Differentiation Gene*). En la señalización extracelular, la unión de la S1P con sus receptores transmite señales intracelulares en vías como las de las GTPasas Rho y Rac o la de Erk/Ras de forma dependiente del subtipo de receptor y la proteína G asociada (Figura I.10). Los receptores de S1P presentan una expresión específica de tejido, de manera que la S1P puede activar distintas vías de señalización y ejercer distintas funciones dependiendo del tejido (Tabla I.1).

FUNCIONES

Como se recoge en la Tabla I.1, la S1P ejerce multitud de funciones, incluyendo el crecimiento y la supervivencia celular, la migración de células neurales, la angiogénesis o el tráfico de linfocitos. Entre todas sus funciones, la S1P tiene efectos importantes sobre los sistemas nervioso, inmune y vascular que pueden ser potencialmente importantes en la fisiopatología de la lesión medular.

Así, en el sistema nervioso central (SNC), la S1P induce vías de señalización que promueven la supervivencia de oligodendrocitos (Jaillard *et al.*, 2005) y neuronas (Mizugishi *et al.*, 2005). También promueve la neurogenesis (Mizugishi *et al.*, 2005), y la proliferación de neuroblastos (Harada *et al.*, 2004). Además, estudios *in vitro* sugieren que la S1P también participa en la extensión de neuritas mediada por NGF (*Nerve Growth Factor*) (Herr & Chun, 2007). Asimismo, este metabolito juega un papel prominente en la modulación de la excitabilidad neuronal (Chi & Nicol, 2010) y modula procesos nociceptivos en la médula espinal a través de la inhibición de la síntesis neuronal de cAMP (*Cyclic Adenosine Monophosphate*) (Coste *et al.*, 2008). A través de sus efectos sobre los oligodendrocitos, la S1P también es capaz de regular los procesos de mielinización y desmielinización de forma dependiente del grado de maduración de estas células (Jaillard *et al.*, 2005). En astrocitos, la S1P estimula la producción de factores de crecimiento (ver Herr & Chun, 2007) y juega un papel importante en la astrogliosis, contribuyendo a la proliferación de los astrocitos (Wu *et al.*, 2008) y a

Receptor	Distribución	Funciones celulares (ejemplos)
S1PR1	Cerebro, corazón, hígado, timo, pulmón, riñón, músculo, ...	Astroцитos: migración Linfocitos B y T: bloqueo de la salida, quimiotaxis Células endoteliales: desarrollo vascular, formación de uniones adherentes Células madre neurales: migración Pericitos: desarrollo temprano del sistema vascular
S1PR2	Cerebro, corazón, hígado, timo, pulmón, riñón, músculo, ...	Cardiomiocitos: supervivencia frente a isquemia/reperfusión Células epiteliales (varios tipos): integridad y desarrollo Células endoteliales: angiogénesis patológica, ruptura de uniones adherentes Hepatocitos: proliferación, remodelación de la matriz Células mastoides: degranulación
S1PR3	Cerebro, corazón, hígado, timo, pulmón, riñón, músculo, testículos, ...	Cardiomiocitos: supervivencia frente a isquemia/reperfusión Células dendríticas (hematopoyéticas): empeoramiento de sepsis, letalidad, inflamación, coagulación
S1PR4	Ganglios linfoides, pulmón	Linfocitos T: migración, secreción de citoquinas
S1PR5	Cerebro, piel, bazo	Células NK: tráfico Oligodendrocitos: supervivencia

Tabla I.1. Distribución tisular y efectos a nivel celular de los diferentes receptores de S1P. La tabla muestra la distribución tisular de los distintos receptores según la expresión de ARN mensajero así como algunos ejemplos de sus funciones dependiendo del tipo de célula considerada. Modificado de Rosen *et al.* (2009).

su activación (Fischer *et al.*, 2011). En la microglía activada, S1P induce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Nayak *et al.*, 2010). En el ámbito específico de la lesión medular, un estudio en un modelo murino de lesión contusiva demostró que la S1P aumenta su concentración durante la fase subaguda, debido fundamentalmente a la acumulación de astrocitos y microglía reactiva, promoviendo la migración de células madre neurales hacia la zona dañada (Kimura *et al.*, 2007).

Los primeros efectos descritos de la S1P y los mejor caracterizados son, sin embargo, los concernientes al sistema inmune y la respuesta inflamatoria. Coherentemente con las observaciones realizadas en microglía, la S1P regula la expresión de diferentes genes relacionados con la inflamación en otros tipos celulares (Lin *et al.*, 2007). Paralelamente, diversas citoquinas clave en la lesión medular como el TNF α (*Tumor Necrosis Factor*) o la interleuquina 1 β inducen la síntesis de S1P, que a su vez contribuye a la respuesta inflamatoria mediada por estos factores (Snider *et al.*, 2010). Sin embargo, el efecto más conocido de la S1P ocurre en la respuesta inmune celular y, particularmente, en el tráfico de linfocitos T. Diferentes estudios han mostrado que estas células migran de los nódulos linfáticos hacia el sitio de lesión según gradientes de concentración de S1P (Chiba *et al.*, 2006). Como consecuencia, el aumento de la concentración de S1P en los nódulos linfáticos bloquea la egrésión celular, causando linfopenia (Schwab *et al.*, 2005). El aumento de S1P también tiene efectos sobre otras células inmunes, causando el aumento del número de neutrófilos en sangre aunque, al tiempo, reduce su reclutamiento en los tejidos inflamados ya que causa defectos en la respuesta celular a los estímulos quimiotácticos (Allende *et al.*, 2011). La S1P también ha demostrado interesantes efectos sobre el reclutamiento de macrófagos (Das *et al.*, 2013; Keul *et al.*, 2011) y en la determinación de su fenotipo (Hughes *et al.*, 2008).

Finalmente, la S1P tiene un papel clave en el desarrollo y la regulación del sistema vascular, promoviendo o inhibiendo la angiogénesis, según el receptor de S1P involucrado (Takuwa *et al.*, 2010). Además, está implicado en el mantenimiento y permeabilidad de la barrera hemato-encefálica (BHE)⁵, aunque su papel específico resulta controvertido ya que mientras algunos estudios sugieren que la S1P bloquea la glicoproteína-P (una bomba de membrana dependiente de ATP) e incrementa la permeabilidad de la BHE (Cannon *et al.*, 2012), otros han propuesto que activa los efectos de esta bomba (Honig *et al.*, 2003) y que, además, ayuda a las células endoteliales a mantener la integridad de la BHE (van Doorn *et al.*, 2012). Asimismo, algunos estudios han demostrado que la S1P es capaz de reducir el daño causado por procesos de isquemia y reperusión, señalando su potencial aplicación en diferentes patologías (Bandhuvula *et al.*, 2011).

Además de los efectos directos de la S1P, su equilibrio con la ceramida y la esfingosina también resulta crucial en diversos procesos. El papel opuesto de la S1P como metabolito pro-mitogénico y pro-supervivencia y de la Cer y la Sph como mediadores de la apoptosis, ha dado lugar al paradigma del reóstato de los esfingolípidos (Cuvillier *et al.*, 1996; Taha *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2013). La Cer y la Sph contribuyen a la apoptosis a través de sus efectos sobre la integridad y la función de mitocondrias y lisosomas, el bloqueo de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, la activación de vías de señalización pro-apoptóticas como JNK y la inhibición de vías de supervivencia como Akt/mTORC1, MAPK/ERK o NF-kappa β (Young *et al.*, 2013). Por su parte, la S1P antagoniza la señalización mediada por Cer y Sph mediante la activación de ERK y la supresión de JNK, entre otras funciones (Cuvillier, 1998; Cuvillier *et al.*, 1996; Strub *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2013).

⁵BHE: este término incluye tanto a la barrera hemato-encefálica como a la barrera hemato-medular.

En el sistema nervioso central, el reostato de los esfingolípidos resulta crucial para determinar el destino celular. Así, el aumento de la concentración intracelular de ceramida y esfingosina induce la muerte celular de neuronas y células gliales (Blázquez *et al.*, 2000; Brugg, 1996; Kanno *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 1998) y promueve la sobreexpresión de la enzima pro-inflamatoria iNOS (Pahan *et al.*, 1998; Won *et al.*, 2004), contrarrestando los efectos neuroprotectores y proliferativos de la S1P previamente descritos (Harada *et al.*, 2004; Jaillard *et al.*, 2005; Mizugishi *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2010). Sin embargo, el aumento de la concentración de ceramida, esfingosina o S1P puede resultar inefectiva en la regulación del destino celular de oligodendrocitos y neuronas debido al reciclaje de los esfingolípidos (*Salvaje Pathway*) en otros esfingolípidos con funciones opuestas (Qin *et al.*, 2010). Esta observación coincide con las sugerencias de otros autores en cuanto a que el sistema nervioso central tiene una regulación del metabolismo de los esfingolípidos particularmente marcada, dando lugar a equilibrios estables entre los metabolitos involucrados en el reóstato de los esfingolípidos (Couttas *et al.*, 2014; Hagen-Euteneuer *et al.*, 2012). La importancia de este equilibrio queda claramente reflejada en el hecho de que sus alteraciones están presentes en casi todas las enfermedades neurodegenerativas. En esclerosis múltiple, el análisis de cerebro de los pacientes mostró reducidos niveles de S1P y elevados niveles de ceramida y Sph en la sustancia blanca afectada así como en las placas de lesión (Qin *et al.*, 2010), mientras que en Alzheimer se ha observado un descenso de la tasa S1P/Sph durante el curso de la enfermedad (Couttas *et al.*, 2014; He *et al.*, 2010). También se han observado resultados similares en esclerosis lateral amiotrófica (Cutler *et al.*, 2002), la enfermedad de Parkinson (France-Lanord *et al.*, 1997), Niemann-Pick (Goldin *et al.*, 1992) o demencia (Haughey *et al.*, 2004).

Considerando todo lo anteriormente expuesto no resulta extraño que, en los últimos años, la modulación de la señalización mediada por S1P y del reóstato de esfingolípidos haya sido postulada como una prometedora estrategia terapéutica para un gran número de patologías neurológicas.

ESTRATEGIAS DE MODULACIÓN DE LA S1P Y SUS EFECTOS

Actualmente, existen diferentes aproximaciones a la hora de modular los niveles de S1P o el reóstato de esfingolípidos. La forma más simple de modular los niveles de S1P es administrar directamente este metabolito. Sin embargo, los estudios realizados con esta aproximación han demostrado que la S1P administrada exógenamente induce un fuerte aumento de la concentración de Sph y Cer. De hecho, en cultivos de neuronas y oligodendrocitos se ha observado que la administración exógena de bajas concentraciones de S1P exógeno (0,25 μ M) induce un aumento del 50% de algunas especies de ceramidas (Qin *et al.*, 2010), posiblemente debido a la activación de la vía de reciclaje de los esfingolípidos (Hagen-Euteneuer *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2010). Estas observaciones junto con las dificultades para su administración *in vivo* debido a su unión a proteínas transportadoras o *carrier* (Bandhuvula *et al.*, 2011) han supuesto que la administración de S1P no haya llegado a plantearse como tratamiento clínico. Para compensar estas limitaciones se han explorado otras alternativas, principalmente basadas en el uso de análogos sintéticos de la S1P como el FYT720 (Gylenya®) capaces de actuar sobre los receptores de S1P. Este compuesto es capaz de actuar como ligando de cuatro de los cinco receptores de la S1P (no actúa sobre S1PR₂) mimetizando, al menos en parte, sus funciones extracelulares. El FYT720 ha sido recientemente aprobado por la FDA (*Food and Drugs Administration*) como el primer tratamiento oral para la esclerosis múltiple (Sharma *et al.*, 2011). El potencial terapéutico de este compuesto para el tratamiento de la lesión medular también ha sido evaluado en

dos laboratorios independientes (Lee *et al.*, 2009; Norimatsu *et al.*, 2012). Los resultados de ambos estudios muestran que el tratamiento con FTY720 mejora la recuperación funcional tras la LME, pero mientras que Lee y colaboradores (2009) atribuyen esta mejoría a cambios en la respuesta inmune, y particularmente en la reducción de la infiltración de células T y la consecuente reducción de la auto-inmunidad inducida por el trauma, Norimatsu *et al.* (2012) proponen que las mejoras en la recuperación se deben también a mecanismos no inmunomoduladores, principalmente a la reducción de la permeabilidad vascular y de la acumulación de astrocitos en la región dañada de la lesión medular.

Esfingosina-1-fosfato liasa

A pesar de los efectos beneficiosos del FTY720, existen evidencias que sugieren que su aplicación clínica puede verse limitada por una elevada incidencia de desórdenes respiratorios y bradicardia tras el tratamiento (Tedesco-Silva *et al.*, 2007) y por los riesgos de otros efectos secundarios causados por la falta de especificidad en su actividad sobre los, por otra parte, ubicuos receptores de S1P (Bandhuvula *et al.*, 2011). Como consecuencia, diferentes laboratorios han enfocado sus estudios hacia la manipulación de la ruta metabólica de los esfingolípidos como una alternativa plausible para modular los niveles de S1P (ver revisión en (Sanllehí *et al.*, 2015). A pesar de que este planteamiento permite actuar sobre diferentes enzimas para incrementar los niveles de S1P y restaurar el equilibrio S1P/Sph, el abordaje más ampliamente estudiado está enfocado a la inhibición de la esfingosina-1-fosfato liasa como herramienta terapéutica.

La SPL es la enzima encargada de degradar irreversiblemente la S1P. Esta proteína, codificada en el gen *Sgpl1*, tiene un peso molecular de aproximadamente 63KDa y una secuencia de 568 aminoácidos con siete dominios transmembrana. Se localiza en el retículo endoplasmático, con el extremo N'-terminal hacia el lumen del orgánulo y el centro activo orientado hacia el citosol (Figura I.11). La SPL pertenece a la superfamilia de enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP), la forma activa de la vitamina B6. La actividad de la SPL fue inicialmente descrita por Stoffel y colaboradores (1969). La SPL cataliza el corte de la S1P en el enlace C2-C3 a través de un mecanismo de acción todavía por esclarecer completamente, aunque estudios recientes (Bourquin *et al.*, 2010) han llevado a postular un modelo (Figura I.12) que supone un empuje importante tanto para estos estudios como para el desarrollo de sistemas para el control de la actividad de esta enzima.

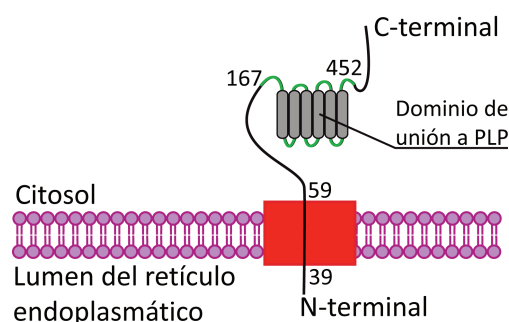


Figura I.11. Estructura de la SPL. La imagen muestra la estructura de la SPL, especificando la orientación del centro activo y la secuencia de aminoácidos implicada en cada dominio de la enzima. Imagen extraída de Saba (2006).

Los efectos de la inhibición de SPL y su potencial terapéutico han sido analizados tanto mediante aproximaciones genéticas, destinadas a reducir su expresión, como mediante aproximaciones farmacológicas, centradas en el bloqueo de su actividad enzimática. En el primer caso, el abordaje experimental más habitual ha sido a través de ratones transgénicos, tanto constitutivos como inducibles. Fenotípicamente, la deficiencia completa de *Sgpl1* causa, entre otros efectos, retrasos en el crecimiento, anemia y linfopenia resultando, finalmente, letal tras el periodo de lactancia (Schmahl *et al.*, 2007), mientras que la deficiencia parcial o la inducida tras el nacimiento también

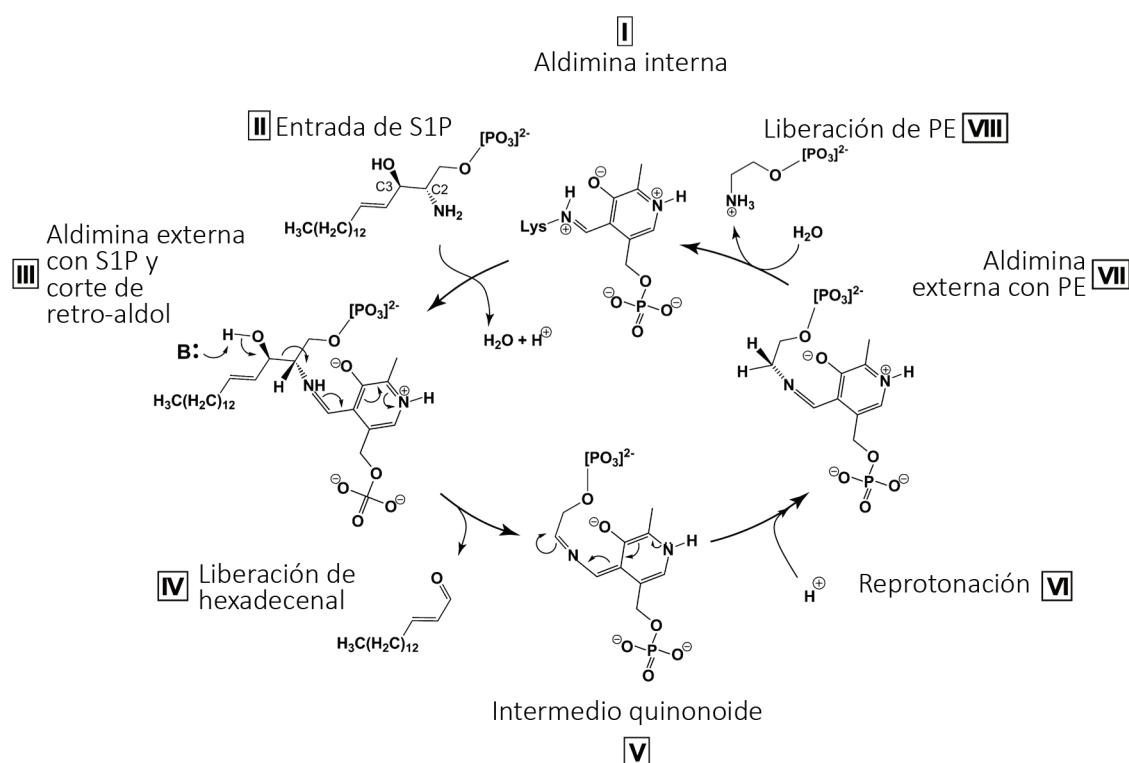


Figura I.12. Mecanismo de degradación de la S1P mediante la SPL. La figura muestra el mecanismo de acción de la enzima SPL en la degradación de la S1P propuesto por Bourquin y colaboradores (2010). El modelo especifica la participación del co-factor PLP y la reorganización electrónica necesaria en cada etapa del ciclo. Modificado de Bourquin et al. (2010).

induce linfopenia pero no otros efectos que reduzcan la esperanza de vida normal (Allende *et al.*, 2011; Bagdanoff *et al.*, 2009; Vogel *et al.*, 2009). Coherentemente con su papel sobre la degradación de S1P, la deficiencia parcial o total de Sgpl1 causa una acumulación de S1P en algunos tejidos y el suero, aunque también se acumulan otros esfingolípidos, posiblemente a consecuencia de la actividad de la vía de reciclaje (Bektas *et al.*, 2010). Funcionalmente, estudios *in vitro* con fibroblastos provenientes de animales SPL^{-/-} han demostrado que la deficiencia de SPL promueve la proliferación y resulta citoprotectora (Colié *et al.*, 2009). En el ámbito más específicamente terapéutico, el potencial clínico del déficit de Sgpl1 se ha explorado fundamentalmente en animales heterocigotos (SPL^{+/-}) o en modelos inducibles, sobre todo en patologías autoinmunes. Entre los primeros, se ha observado que la deficiencia parcial causa un aumento de la concentración de S1P y reduce la inflamación y el daño tras lesiones agudas en pulmón (Zhao *et al.*, 2011) así como en lesiones cardíacas de isquemia/reperfusión (Bandhuvula *et al.*, 2011). Por su parte, la inducción puntual de la deficiencia de Sgpl1 ha demostrado ser citoprotectora frente a los efectos de la encefalomiелitis autoinmune experimental, un modelo de esclerosis múltiple (Billich *et al.*, 2013). Sin embargo, los efectos en este modelo no parecen estar relacionados con alteraciones locales de los niveles de S1P en el cerebro, sino que probablemente son debidos a la modulación de la respuesta inmune ya que la delección de Sgpl1 en el cerebro es reducida, quizás por la escasa penetración del fármaco inductor (tamoxifen) a través de la barrera hematoencefálica (Billich *et al.*, 2013). Cabe mencionar que también se han realizado estudios empleando ratones transgénicos inducibles en una región específica (v.g.: el intestino), consiguiendo cerca de la inactivación completa de la expresión de SPL en la región deseada sin afectar a otros tejidos (Degagné *et al.*, 2014).

Además de la inhibición génica de Sgpl1 se han explorado otras herramientas, fundamentalmente inhibidores farmacológicos, cuyo fin es reducir la actividad de la SPL para incrementar así los niveles de S1P. Así, por ejemplo, algunos estudios han demostrado que el FTY720 es capaz de bloquear la actividad de SPL (Bandhuvula *et al.*, 2005), aunque la inhibición es escasa y sus efectos no son claros debido a las funciones de este compuesto como agonista de los receptores de S1P (Kumar & Saba, 2009). Algo similar ocurre con el inhibidor GT-11 que, a altas concentraciones, provoca una acumulación de S1P y dhS1P actuando como inhibidor de la SPL pero que, a bajas concentraciones, se comporta como inhibidor específico (el primero descrito) de la enzima hidrocaramida desaturasa (Triola *et al.*, 2004). La SPL también puede ser inhibida por metales divalentes como el Ca^{2+} o el Zn^{2+} , pero sus aplicaciones terapéuticas son nulas (Ven Veldhoven & Mannaerts, 1991).

Entre los inhibidores farmacológicos de SPL se incluyen también diversos compuestos análogos a su co-factor PLP, como por ejemplo la 4-deoxipiridoxina (DOP; Coburn *et al.*, 1981) o inhibidores competitivos del mismo, como el THI (Schwab *et al.*, 2005) o el LX2931 (Bagdanoff *et al.*, 2010). Aunque estos compuestos inhiben la actividad de la SPL (Bagdanoff *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013; Schwab *et al.*, 2005), pueden ser ineficaces si la concentración de PLP o su precursor (vitamina B6) en el tejido es suficientemente alta o si se administra exógenamente esta vitamina (Schwab *et al.*, 2005). De hecho, aunque THI ha demostrado claramente su eficacia *in vivo* causando procesos de linfopenia esperables por la acumulación de S1P y la acumulación de linfocitos en los nódulos linfáticos (Sinkeldam *et al.*, 1988), no muestra ningún efecto *in vitro* debido a la presencia de vitamina B6 en los medios de cultivos (Ohtoyo *et al.*, 2014). En cuanto a su función terapéutica, los efectos de la inhibición de SPL mediante estos inhibidores han sido analizados en diferentes modelos experimentales, demostrando su capacidad de reducir el daño tisular cardíaco asociado a lesiones por isquemia-reperfusión (Bandhuvula *et al.*, 2011), promover la regeneración muscular y funcional en animales con distrofia (Ieronimakakis *et al.*, 2013), promover la supervivencia de trasplantes de isletas pancreáticas (Lee *et al.*, 2013) y reducir los efectos de la artritis reumatoide (Bagdanoff *et al.*, 2010). No obstante, el tratamiento con este grupo de inhibidores –análogos o competitivos con el co-factor– tiene el riesgo de efectos secundarios ya que presentan una elevada inespecificidad debida a su mecanismo de acción a través de PLP, co-factor de diversas enzimas además de SPL, como la serina palmitoil transferasa (SPT), responsable de la síntesis *de novo* de los esfingolípidos (Bourquin *et al.*, 2011).

También se han desarrollado inhibidores farmacológicos de la SPL, cuya estructura molecular es análoga a los sustratos de la SPL (Sanllehi *et al.*, 2015). El primero en ser descrito fue la 1-desoxidihidroesfingosina-1-fosfonato, un inhibidor competitivo con alta toxicidad (Stoffel & Grol, 1974). En este grupo también se incluye la 2-vinilesfinganina-1-fosfato (2VS1P), un esfingolípido sintético análogo a la dhS1P (Boumendjel & Miller, 1994). Aunque se desconoce con exactitud el mecanismo por el cual el 2VS1P actúa sobre la actividad de SPL, ha sido propuesto como un inhibidor de tipo irreversible en base a que la reactividad del grupo vinilo podría provocar que este compuesto estuviese reaccionando de manera covalente con la enzima (Boumendjel & Miller, 1994). Desafortunadamente, hasta la fecha, apenas existe información bibliográfica sobre su efectividad como tratamiento terapéutico. Recientemente, investigadores del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC, CSIC) han desarrollado nuevos inhibidores siguiendo esta misma aproximación. Estos

inhibidores –basados en la mezcla de los cuatro estereoisómeros que constituyen el 2VS1P (RBM-6.24) y en su separación enantiomérica (RX-115 y RX-116) así como en un análogo sin fosforilar (RBM-6.31)– junto con otros (RBM-7.12 y RBM-7.32) basados en el mecanismo de degradación de la S1P mediante la SPL propuesto por Bourquin *et al.*, 2010 (Figura I.13) serán objeto de análisis en esta tesis y se describen en detalle en el apartado específico de este documento (apartado 4).

Durante la fase final de la preparación de esta tesis, un grupo de investigadores perteneciente a la compañía farmacológica Novartis publicó un artículo describiendo nuevos inhibidores de la SPL capaces de atravesar la BHE, pero sin inducir grandes cambios en la concentración de S1P en el sistema nervioso central (Weiler *et al.*, 2014). En el estudio publicado, la administración de uno de los inhibidores descritos en el mismo artículo (compuesto 31) mostró resultados positivos en el tratamiento de animales afectados de encefalomiелitis autoinmune experimental. A pesar de los prometedores resultados señalados por los autores, hasta la fecha no se ha publicado ninguna información adicional sobre la efectividad de los demás compuestos descritos, ni se ha profundizado en la viabilidad y potencialidad del tratamiento con el compuesto 31 en distintas patologías. Además, desafortunadamente, hasta el momento estos compuestos no se encuentran disponibles comercialmente para su estudio.

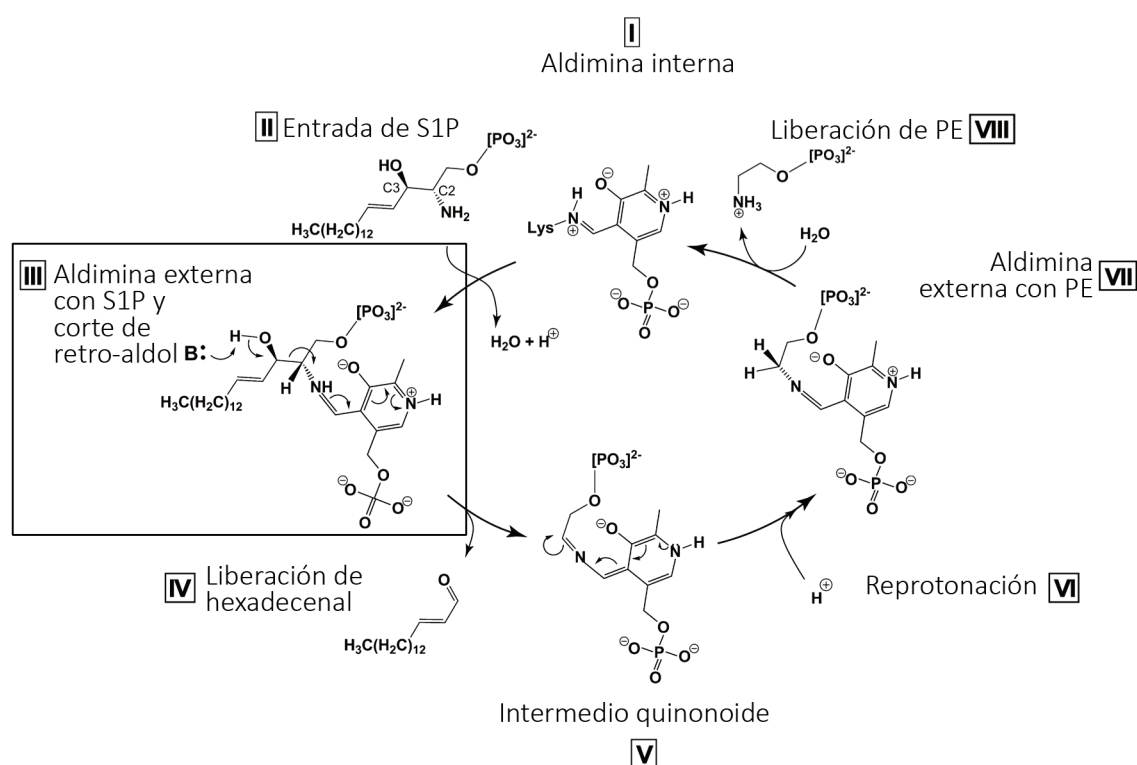


Figura I.13. Fundamento estructural de los inhibidores RBM-7.12 y RBM-7.32. La imagen muestra el mecanismo de degradación de la S1P mediada por SPL propuesto por Bourquin *et al.*, 2010. En ella, aparece señalado en un recuadro el intermedio de la degradación en el que están basados los inhibidores RBM-7.12 y RBM-7.32 desarrollados por investigadores del iQAC-CSIC de Cataluña.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La cascada de eventos biológicos que acaecen en la fase secundaria de la lesión medular traumática (LME) exacerba los daños celulares y tisulares provocados por el trauma inicial, agravando severamente el pronóstico de la lesión. A pesar de las numerosas aproximaciones investigadas para el tratamiento de la lesión medular, hasta la fecha no existe ningún tratamiento aceptado por las agencias médicas responsables que sea capaz de reparar los daños causados por la lesión medular. Por ello, resulta imprescindible continuar investigando e identificar potenciales dianas sobre las que desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

En los últimos años, numerosos estudios han puesto de manifiesto la amplia participación de los esfingolípidos en distintos procesos que ocurren en múltiples patologías, incluyendo patologías neurodegenerativas. Entre estos esfingolípidos, la participación de la esfingosina-1-fosfato (S1P) ha demostrado ser clave en múltiples eventos, motivo por el cual este metabolito ha suscitado el interés de gran parte de la comunidad científica. Además, numerosos estudios han demostrado la potencialidad terapéutica de la modulación de la esfingosina-1-fosfato liasa (SPL), la enzima encargada de la degradación irreversible de S1P, en distintas patologías. Interesantemente, muchos de los eventos en los que participa la S1P también tienen lugar en la fase secundaria de la lesión medular. Sin embargo, la conexión entre este metabolito y la lesión medular apenas ha sido explorada.

Considerando la información previamente disponible, los estudios llevados a cabo en la presente tesis están basados en las siguientes **premisas**:

1. Es posible mejorar el pronóstico de la lesión medular actuando sobre su fase secundaria.
2. La S1P participa en la regulación de procesos -como la apoptosis, la reactividad glial o la inflamación- que, a su vez, tienen lugar durante la fase secundaria de la LME.
3. Los niveles de S1P dependen de la expresión y actividad de SPL.

En base a todo lo anteriormente expuesto planteamos las siguientes **hipótesis**:

1. Los cambios que se producen tras una LME alteran los niveles de esfingolípidos.
2. Los cambios en los niveles de esfingolípidos contribuyen a la fisiopatología de la LME.
3. El aumento de los niveles de S1P repercute beneficiosamente en la evolución de una LME.
4. La inhibición de la SPL permite incrementar los niveles de S1P.

El **objetivo principal** de esta tesis es contrastar estas hipótesis y **evaluar el potencial de incrementar la concentración de S1P mediante la inhibición de SPL como terapia para la LME**. Para alcanzar este objetivo y considerando la escasa información previa disponible, los sub-objetivos planteados son los siguientes:

1. Caracterizar los cambios de concentración de los esfingolípidos que ocurren durante la fase subaguda de la LME.
2. Caracterizar los cambios de expresión (génica y proteica) y actividad enzimática de la SPL durante la fase subaguda de la LME.

3. Evaluar si la inhibición parcial de la expresión de Sgpl1 induce mejoras funcionales y/o sensoriales tras la LME.
4. Evaluar la viabilidad y la efectividad de nuevos inhibidores farmacológicos de la SPL.

De acuerdo con este esquema, la presente tesis se ha organizado en cuatro apartados que abordan cada uno de estos sub-objetivos de manera individual. Cada apartado está diseñado como un bloque independiente constituido por una sección de introducción, de resultados y de discusión propias con la intención de facilitar la organización, comprensión y discusión de los resultados. Antes de estos apartados se incluye un capítulo de materiales y métodos donde se describen en detalle todos los protocolos empleados durante el desarrollo de la tesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

PROCEDIMIENTOS *IN VIVO*

ANIMALES UTILIZADOS Y DECLARACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE LA LEGISLACIÓN VIGENTE

Para la realización de esta tesis se utilizaron ratones silvestres de la cepa C57BL/6J (WT) provenientes del bioterio del Hospital Nacional de Parapléjicos (SESCAM) y de las compañías Charles River y Harlan, así como ratones de la misma cepa deficientes en SPL donados por el Dr. Van Veldhoven de la Universidad Katholieke de Leuven (Bélgica). Generalmente, se utilizaron hembras de ratón de 12-14 semanas (20-25g), a excepción de los ensayos en los que se especifique lo contrario. Los animales adquiridos de las compañías Charles River y Harlan se mantuvieron en cuarentena durante una semana para evaluar su estado de salud y adaptarlos a las condiciones del bioterio del centro. El bioterio se encuentra adaptado para el mantenimiento de unas condiciones óptimas de temperatura, humedad y ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Como alimentación básica se utilizó el pienso Teklad Global Rodents Diets® (Harlan Laboratories) administrándose, al igual que el agua, *ad libitum* en todos los casos.

Todos los procedimientos con animales fueron realizados de acuerdo con la normativa R.D. 1201/2005 10-10 y el R.D. 53/2013 del Ministerio de Agricultura de España y tras su aprobación por el Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Nacional de Parapléjicos (Número de identificación 95/2012).

GENOTIPADO DE RATONES TRANSGÉNICOS SPL+/+ Y SPL+/-

En la generación de la cepa de ratones transgénicos deficientes en el gen de la SPL (Sgpl1), el Dr. Van Delhoven y su equipo insertaron LacZ, el gen de la β -galactosidasa (β -Gal), dentro de la región codificante del gen Sgpl1. De esta forma, el gen de la β -Gal imposibilita la transcripción del gen Sgpl1 a la vez que actúa como gen reportero de la mutación. El objetivo del genotipado es determinar si los animales en estudio poseen la deficiencia genética de Sgpl1.

Analizando simultáneamente la presencia de Sgpl1 y/o LacZ, se pueden distinguir entre ratones:

Silvestres o "Wild type" (SPL+/+): no han sufrido ninguna modificación en el gen Sgpl1. El fragmento analizado del gen aparece a 499pb y es la única banda observable.

Transgénicos heterocigotos (SPL+/-): la modificación en Sgpl1 se produce solamente en uno de los alelos, manteniéndose el otro alelo inalterado. Estos ratones presentan tanto el gen Sgpl1 y como LacZ (667pb).

Transgénicos homocigotos (SPL/-): la modificación en Sgpl1 se produce en ambos alelos. En este caso no se detecta el gen Sgpl1 sino, únicamente, el gen LacZ.

En la presente tesis utilizamos ratones transgénicos heterocigotos (SPL+/-), con expresión reducida de Sgpl1 debido a que los ratones transgénicos homocigotos (SPL/-) presentan una escasa viabilidad tras el periodo de lactancia. Los ratones SPL+/- no muestran alteraciones fenotípicas evidentes ni problemas en su viabilidad.

Para el mantenimiento de la colonia transgénica utilizamos cruzamientos entre hembras SPL +/- y machos SPL +/- . Ocasionalmente, refrescamos la colonia transgénica cruzando ratones WT con ratones SPL+/-.

Disoluciones y primers (cebadores) utilizados

Las disoluciones empleadas para el genotipado de los ratones transgénicos son las siguientes:

1. Tampón de lisis:

SDS al 10% (p/v): SDS (Sigma; #L4390). Diluir en agua destilada.

5M NaCl: NaCl (Sigma; #S7653). Diluir en agua destilada.

1M Tris-HCl pH 8,0: Trizma base (Sigma; #T6066). Diluir en agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 con HCl 12N (Sigma; #30721) y enrasar con agua destilada.

0,5M Na₂EDTA pH 8,0: (Afflymetrix-USB; #15694)

Mezclar los siguientes reactivos a R/T para obtener el tampón de lisis:

Reactivo	Volumen	Concentración Final
SDS 10%	5mL	0,5%
5M NaCl	2mL	0,1M
1M Tris pH 8,0	5mL	50mM
0,5M Na ₂ EDTA pH 8,0	500μL	2,5mM

Tabla M.1. Tampón de lisis para el genotipado. La tabla muestra el nombre, la cantidad y las características comerciales de los reactivos requeridos para preparar el tampón de lisis para el genotipado.

2. Solución para PCR:

Preparar la mezcla maestra ("master mix") para la amplificación por PCR combinando los siguientes reactivos:

Reactivo	Casa comercial	#Catálogo	Volumen (μL)/muestra
Buffer 10x PCR (Mg ²⁺ free)	Biotools	#20.035-4183	2,5
dNTPs mix 10mM	Fisher Scientific	1031-9879	1,0
Primers Gal 10μM	Sigma	Ver Tabla M.3	1 (forward) + 1 (reverse)
Primers SPL 10μM	Sigma	Ver Tabla M.3	0,5 (forward) + 0,5 (reverse)
Taq. Polimerasa	Biotools	10043	1,0
MgCl ₂ 50mM	Biotools	#20.036-4184	1,5
H ₂ O _{mQ}	-	-	16

***Nota:** para evitar el deterioro de los reactivos y asegurar la viabilidad del ensayo, será necesario realizar todo el procedimiento en hielo.

Tabla M.2. Solución para la amplificación mediante PCR (genotipado). La tabla muestra el nombre, la cantidad y las características comerciales de los reactivos requeridos para preparar la mezcla maestra para la amplificación por PCR.

Los cebadores o *primers* empleados para la detección del gen de la β-Gal y el Sgpl1 son los siguientes:

Secuencia	Casa comercial	Código	Stock
Gal-f: 5'-CGAATACCTGTTCCGTCATAGC-3'	Sigma	HA03298987	10μM
Gal-r: 5'-ACCACTACCATCAATCCGGTAG-3'	Sigma	HA03298988	10μM
mSPL-f: 5'-TGATAGGGCTGAAAACCACTG-3'	Sigma	HA03298989	10μM
mSPL-r: 5'-TCAGAAGCAAACTGCCTTG-3'	Sigma	HA03298990	10μM

Tabla M.3. Listado de primers empleados para el genotipado. La tabla muestra la secuencia de cada primer, sus características comerciales y la concentración "stock" empleada.

3. Tampón TBE 10x:

1. Disolver 108g de Trizma Base (Sigma; #T1503) y 55g de ácido bórico (USB; #76324) en 900mL de agua destilada.
2. Añadir 40mL de 0,5M Na₂EDTA pH 8,0.
3. Enrasar hasta 1 litro con agua destilada.

Procedimiento

Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN que utilizamos para ratones de 21 días de edad (P21) es el siguiente:

1. Cortar, aproximadamente, 5 mm del extremo distal de la cola del ratón.
2. Disgregar la muestra en 400μL de tampón de lisis con 20μL de proteinasa K (Roche; #03115828001). Incubar a 63°C con una agitación de 550rpm durante toda la noche utilizando una placa calefactora (Themomixer Comfort; Eppendorf).
3. Añadir 75μL de acetato potásico (Sigma; #P1190) 8M y 500μL de cloroformo (Fisher Chemical; #C/4920/21). Mezclar por inversión. Incubar a 4°C durante 1 hora.
4. Centrifugar a 17.900xg durante 10 min a R/T.
5. Pasar la fase superior acuosa (~400μL) a un tubo nuevo. Añadir 2 volúmenes (~800μL) de etanol absoluto (Appllichem Panreac; #131086.1214) y mezclar por inversión.
6. Centrifugar a 17.900xg durante 5 min a R/T. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado de ADN con 100μL de etanol al 70%.
7. Dejar secar las muestras durante 25 minutos a R/T.
8. Resuspender el precipitado de ADN en 100μL de H₂O_{mQ}.

Para el genotipo de los ratones de 0 a 3 días de edad (P0-P3), realizamos algunas modificaciones en el protocolo de extracción de ADN anteriormente descrito. El protocolo modificado (reducido) es el siguiente:

1. Sacrificar los ratones P0-P3 y homogeneizar el tejido pasándolo por una jeringa.
2. Añadir 400μL de tampón de lisis y 20μL de proteinasa K e incubar a 95°C, con agitación de 550rpm durante 15min.
3. Añadir 75μL de acetato potásico 8M y 500μL de cloroformo. Mezclar por inversión. Incubar a -20°C durante 15min.
4. Centrifugar a 17.900xg durante 10 min a R/T.
5. Pasar la fase superior acuosa (~400μL) a un tubo nuevo. Añadir 800μL de etanol absoluto y mezclar por inversión.
6. Precipitar el ADN centrifugando a 17.900xg durante 5 min a R/T. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado de ADN con 100μL de etanol al 70%.
7. Dejar secar las muestras durante 25 minutos a R/T.
8. Resuspender el precipitado de ADN en 100μL de H₂O_{mQ}.

Amplificación de genes mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

1. Mezclar 24,75µL de la solución para PCR y 0,25µL del ADN obtenido.
2. Amplificar el ADN mediante PCR en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler; Bio-rad) utilizando el siguiente programa:

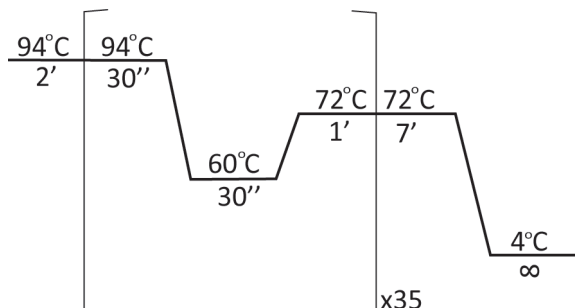


Figura M.1. Programa de PCR para el genotipado. La figura muestra la temperatura, el tiempo y el número de ciclos empleados para llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de *Sgpl1* y *LacZ* mediante PCR.

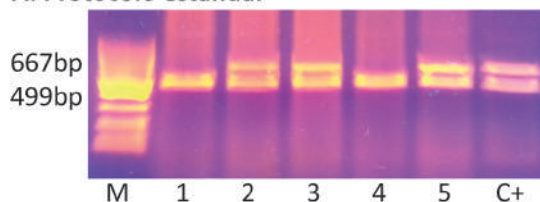
Resolución por electroforesis en gel de agarosa

Para separar los fragmentos amplificados en la PCR, hicimos una electroforesis en gel de agarosa. Las pautas seguidas se recogen en el siguiente protocolo:

- i. Añadir 3µL de tampón de carga 6x (Thermo Scientifics, #R0611) a las muestras obtenidas de la amplificación por PCR y cargarlas en un gel de agarosa (Conda; #8021) al 0,8% (p/v) en TBE 0,5x al cual se le añaden 5-10µL de bromuro de etidio 10mg/mL (Sigma; #E1510).
- ii. Cargar 5µL de marcador de peso molecular (100pb. Biotools; #31.006) en uno de los pocillos del gel de agarosa.
- iii. Realizar la electroforesis a voltaje constante (110V) conectando el equipo a una fuente de alimentación (Power-Pac Basic™; Bio-rad) y dejar resolver el gel durante 25min.
- iv. Visualizar los resultados en un transiluminador (Gel Logic 1500 Imaging System) bajo luz ultravioleta.

Como se aprecia en la Figura M.2, el fragmento correspondiente al gen de la SPL tiene un tamaño de 499KDa mientras que el de la β -Gal es de 667KDa permitiendo diferenciar entre animales SPL+/+ y SPL +/- . Para comprobar la eficacia del protocolo reducido de extracción de ADN puesto a punto en nuestro laboratorio, analizamos muestras de 5 ratones P0-P3 con los dos protocolos anteriormente descritos. Así pues, comprobamos

A. Protocolo estándar



B. Protocolo reducido

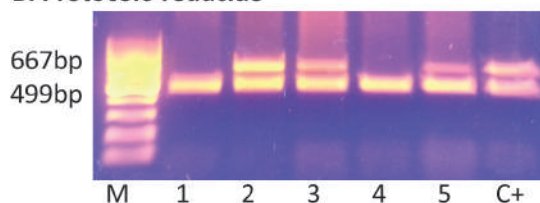


Figura M.2. Comparación de los protocolos de genotipado. En la imagen se muestran los resultados obtenidos para el genotipado de 5 ratones P0-P3 utilizando el protocolo estándar (A) y el protocolo reducido (B) de extracción de ADN. M=marcador; 1, 2, 3, 4 y 5 = individuos 1 (SPL+/+), 2 (SPL+/-), 3 (SPL+/-), 4 (SPL+/+) y 5 (SPL+/-), respectivamente; C+= control positivo (SPL+/+).

que la cantidad de ADN obtenido mediante el protocolo de extracción reducido es suficiente para llevar a cabo el genotipado con resultados equivalentes a los obtenidos con el protocolo estándar (Figura M.2). Por ello, decidimos utilizar el protocolo de extracción reducido como técnica rutinaria para el genotipado de ratones P0-P3.

MODELO MURINO DE LME POR CONTUSIÓN: PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Para la presente tesis utilizamos un modelo murino de lesión traumática por contusión moderada en el segmento medular 11, correspondiente a la vértebra T9. Iniciamos el proceso con una laminectomía para exponer la médula espinal y, posteriormente, realizamos una lesión moderada por contusión. Comparamos los datos de los animales lesionados con animales control –animales no sometidos a cirugía–.

A continuación se detalla el protocolo seguido para la laminectomía y contusión:

1. Anestesiarse el ratón en una cámara de metacrilato utilizando como anestesia inhalatoria isoflurano (Baxter; PDG9623) al 2% en un flujo de oxígeno de 1L/min.
2. Rasurar la línea media dorsal del animal desde la cadera hasta la región situada entre las escápulas.
3. Proteger los ojos del animal aplicando lubricante ocular (LubriThal™; Dechra).
4. Colocar la cabeza del ratón en la cabina de anestesia inhalatoria, inmovilizándolo con cuidado para evitar pérdidas de anestesia y facilitar la cirugía. Durante la operación, mantener la sedación aumentando el porcentaje de isoflurano al 1,5% en un flujo de oxígeno de 1,5L/min.
5. Desinfectar la zona rasurada con povidona (Betadine®; Meda Pharma) y etanol al 70%.
6. Con ayuda de un escalpelo, realizar una incisión sagital en la piel sobre la línea media dorsal comenzando en la región situada entre las escápulas. Extender el corte 1,5-2cm en sentido caudal, exponiendo la musculatura (Figura M.3).
7. Separar la piel y retirar la grasa existente con ayuda de unas tijeras de punta roma.
8. Sujetar la piel con un blefarostato y exponer la región de interés.
9. Localizar la vértebra T9. La vértebra T9 se puede identificar tomando como referencia el vaso sanguíneo prominente situado entre las vértebras T6 y T7 o bien por la inclinación de su apófisis. En sentido rostral-caudal, la inclinación de la apófisis de T9 es notablemente superior a la inclinación del resto creándose, como consecuencia, una cavidad (separación) mayor entre las apófisis de las vértebras T8 y T9 que la existente entre las demás vértebras torácicas. Además, otra característica destacable para su correcta identificación es que a continuación de T9 puede palpase la agrupación de apófisis formada por las vértebras T10-T12; claramente más cercanas entre sí que el resto de vértebras torácicas (Figura M.4).



Figura M.3. Exposición de la columna vertebral. La imagen muestra la región dorsal del animal (rasurada y desinfectada) en el momento de realizar la incisión sagital que da acceso a la musculatura que recubre la columna vertebral. Imagen extraída de The Ohio State University (2007).

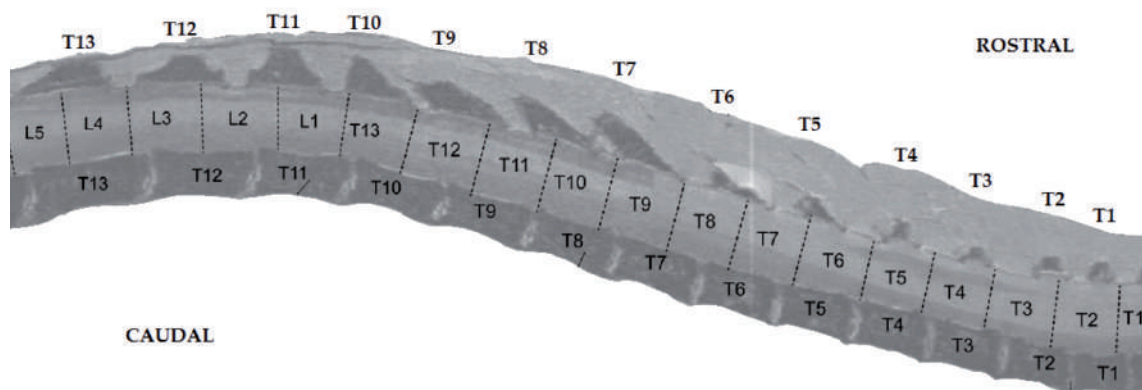


Figura M.4. Vértebras y segmentos medulares del ratón. En la imagen se identifican las vértebras torácicas con sus correspondientes segmentos medulares torácicos (T) y lumbares (L).

10. Realizar una incisión sagital en la musculatura a los lados de la columna vertebral con ayuda de unas microtijeras.
11. Con una pinza gubia eliminar los músculos situados entre las vértebras T8-T10 para exponer la columna vertebral.
**Nota: Es importante limpiar lateralmente las vértebras T8 y T10 ya que servirán de anclaje para estabilizar la columna durante la contusión.*
12. Una vez expuestas las 3 vértebras, eliminar la apófisis espinosa vertebral de T9 con una pinza gubia.
13. Eliminar la parte ósea dorsal de la vértebra T9, usando unas pinzas de micropunta Nº5, para exponer la médula espinal (Figura M.5). Eliminar cualquier fragmento de hueso para permitir que la sonda del contusor impacte en la médula espinal aplicando exactamente la fuerza programada, sin interferencias que puedan comprometer las características y reproducibilidad de la lesión.
14. Inmovilizar la columna con ayuda de unas pinzas sujetando el cuerpo de las vértebras T8 y T10.
15. Colocar la sonda del contusor sobre la médula expuesta y realizar la contusión programada a 50kdinas. Para ello usamos un dispositivo Infinite Horizont (IH) Spinal Cord Impactor (Precision System and Instrumentation). En este punto, es importante colocar la sonda de modo que impacte únicamente sobre la médula espinal.
16. Quitar las pinzas de sujeción y colocar un trozo de grasa del propio animal sobre el área dañada para proteger la médula, ya que en este momento carece de protección ósea.
17. Con hilo del Nº 4 (Vicryl®; Ethicon), coser la musculatura y, seguidamente, coser la incisión de la piel haciendo una sutura continua simple (Figura M.6).



Figura M.5. Exposición de la médula espinal. La imagen muestra la región de médula espinal correspondiente a la vértebra T9 expuesta tras la laminectomía, sin fragmentos de músculo o hueso, para realizar la contusión. Imagen extraída de The Ohio State University (2007).



Figura M.6. Sutura de la piel tras la cirugía. La imagen muestra el dorso del animal tras la sutura (continua simple) empleada al final del proceso quirúrgico. Imagen extraída de The Ohio State University (2007).

18. Tras la operación, administrar por inyección subcutánea 200µL de una dilución 1:4 de antibiótico enrofloxacina (Baytril® 2,5%; Bayer; #570216.2) en suero salino 0,9% de cloruro sódico (Baxter; #619023) y 33µL de una dilución 1:10 de analgésico buprenorfina (Buprex®; RB Pharmaceuticals Limited; #8032910) en suero salino 0,9% de cloruro sódico. Repetir la administración durante dos días tras la operación. **Nota: Administramos hasta 1mL de suero glucosado (Baxter; #617076) mediante inyección subcutánea en este momento a aquellos animales que durante la operación hubieran perdido sangre debido a cualquier complicación.*
19. Dejar al animal sobre una manta calefactora a 37°C hasta que se recupere de la anestesia. Mantener en una jaula individual, con comida húmeda y biberón de tetina larga.

Durante la siguiente semana, evaluamos el peso y la micción de los ratones lesionados para poder detectar cualquier anomalía. En los primeros días tras la lesión, los ratones pierden el control voluntario del vaciado de la vejiga por lo que es necesario vaciársela manualmente una vez al día. Para ello basta con localizar la vejiga palpando la zona abdominal con los dedos índice, corazón y pulgar y ejercer una presión constante sobre la vejiga hasta su completo vaciado. Durante la micción determinamos el tamaño de la vejiga (grande, mediana o pequeña), la presión necesaria para la expulsión de orina (suave, medio o fuerte) y su coloración (clara, turbia o ensangrentada). En aquellos animales con orina turbia o ensangrentada será necesario inocular dosis de antibiótico iguales a las post-operatorias para tratar posibles infecciones. Descartar aquellos animales con una infección prolongada más allá de 2 días.

EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL

Existen diferentes test que permiten evaluar las funciones motora y sensitiva que presenta un animal tras la lesión. En general, llevamos a cabo la evaluación funcional de los animales semanalmente. Adicionalmente, realizamos una primera evaluación dos días después de la contusión para confirmar si el animal presenta la limitación de movilidad esperada. Si la recuperación es mayor de lo esperado (BMS score mayor de 3 en animales silvestres sin tratamiento), asumimos algún problema en la contusión, y descartamos el animal para el estudio.

Evaluación Motora

Basso Mouse Scale (BMS)

Para comprobar la efectividad de la lesión y evaluar el progreso en la recuperación de los animales realizamos una evaluación de la función motora en campo abierto. Para ello empleamos la escala Basso Mouse Scale (Basso *et al.*, 2006). Esta escala de 9 puntos evalúa la locomoción, durante cuatro minutos, en un campo abierto basándose en los parámetros que se recogen en la Figura M.7 y que se detallan a continuación:

1. **Movimiento de tobillo** (“Anckle Mvt”)
 - i. Nulo: pata extendida. No presenta movimiento de tobillo.
 - ii. Ligero: movimiento menor que la mitad del rango de movimiento de la articulación.
 - iii. Extensivo: movimiento mayor que la mitad del rango de la articulación.
2. **Apoyo plantar** (“Plantar Placement”): apoyo de las patas traseras tocando el suelo con todos los dedos.

MOUSE # _____ DATE: _____ DPO: _____ SCORE: L _____ R _____

Ankle Mvt		Plantar W/O Supp.		W Supp.		Stepping				Coord	Paw Position				Trunk Instability			Tail	
L	R	L	R	L	R	Dorsal L	Dorsal R	Plantar L	Plantar R		L.C.	L.O.	L	R	L	R	SEVERE		MILD
Ø	Ø	L	R	L	R	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø*	I	I	I	I					Down
S	S					O	O	O	O	Some	E	E	E	E					Up&Down
E	E					F	F	F	F	Most	P	P	P	P					Up
						C	C	C*	C*										

Comments: _____

Ø - No Mov't
 S - Slight Mov't
 E - Extensive Mov't

Ø - None
 O - Occasional
 F - Frequent
 C - Consistent
 *: <5 missed steps or dorsal steps

IC - Initial Contact
 LO - Lift Off
 I - Internal Rotation
 E - External Rotation
 P - Parallel
 +: none or <3 assessable pass

**: no events or instances of severe and <5 instances of mild
 #: ≥ 5 scores severe trunk

SUBSCORE TALLY	
Plantar Stepping	Score
Freq = 0; Consistent = 1	L _____
	R _____
Coordination	
None = 0; Some = 1; Most = 2	_____
Paw Position	
Rotated thru out = 0	_____
Parallel and rotated = 1	L _____
Parallel thru out = 2	R _____
Trunk	
Severe = 0; Mild = 1; Normal = 2	_____
Tail	
Down, Up&Down = 0; Up = 1	_____
TOTAL SUBSCORE	_____

Copyright © 2003 DM Ratno

Figura M.7. Hoja de anotaciones de la escala BMS. En la imagen se muestran los distintos parámetros evaluados en el test del BMS. Los detalles de cada parámetro se describen en el texto.

- i. Sin soporte: el animal es capaz de apoyar todos los dedos sobre el suelo, pero es incapaz de soportar su peso.
- ii. Con soporte: las patas traseras elevan el extremo posterior del animal, el más cercano a la base de la cola, quedando separado del suelo.
3. **Pasos** ("Stepping"): definimos "paso" como una secuencia iniciada en una posición de soporte de paso seguida por un avance de las extremidades y un restablecimiento del soporte del peso.
 - i. Dorsal: paso con apoyo del dorso de la pata contra el suelo, quedando la región palmar expuesta en algún momento.
 - ii. Plantar: paso con apoyo de la pata tocando el suelo con todos los dedos.
 - iii. Nulo: no realiza ningún paso.
 - iv. Ocasional: menos de la mitad, o la mitad, del movimiento de avance del ratón se produce por pasos completos.
 - v. Frecuente: más de la mitad del movimiento de avance del ratón se produce por pasos completos.
 - vi. Consistente: paso plantar todo el tiempo con menos de cinco pasos perdidos debido a: un mal apoyo de la extremidad, otros movimientos anómalos ("trasero bajo", "rodilla baja", etc.) o pasos dorsales.
4. **Coordinación** ("Coord"): en un paso normal las extremidades anteriores y posteriores se mueven coordinadamente. Partiendo de una posición de inicio en la que ambas extremidades se encuentran lo más cercanas posibles y a la altura media del cuerpo del ratón, el paso se inicia con un movimiento de avance de la extremidad anterior, maximizando la distancia con la pata trasera. En el siguiente movimiento, la extremidad anterior se mantiene quieta, mientras que la posterior avanza, volviendo a la posición de inicio. Visualmente, los pasos de ratón recuerdan al movimiento de unas tijeras. Para evaluar la coordinación, el ratón debe moverse a una velocidad consistente en un trayecto de, al menos, 3 veces la longitud de su cuerpo.
 - i. Nula: el ratón ejecuta menos tres trayectos evaluables.

- ii. Alguna coordinación: la mayoría de trayectos evaluables no son coordinados.
- iii. Mayormente coordinado: la mayoría de los trayectos evaluables son coordinados.
- 5. **Posición de las patas** (*"Paw Position"*): evalúa la posición de los dedos de las patas con respecto al cuerpo, tanto al inicio del movimiento (*"Initial Contact"*) como al final (*"Lift Off"*).
 - i. Rotadas hacia el interior (I): Los dedos de las patas están girados hacia el interior, es decir, hacia la línea media del cuerpo.
 - ii. Rotadas hacia el exterior (E): Los dedos de las patas están girados hacia el exterior del cuerpo.
 - iii. Paralelas (P): Los dedos de las patas están paralelos al eje anteroposterior del cuerpo.
- 6. **Estabilidad del tronco** (*"Trunk Instability"*):
 - i. Inestabilidad severa: se caracteriza porque:
 - 1) Las extremidades traseras muestran severos déficits posturales tales como: inclinación extrema, andares de pato (*"waddle"*) pronunciados y/o movimientos cercanos a la caída repentina de los cuartos traseros de forma predominante durante el test.
 - 2) Se detiene el paso en cinco o más ocasiones por alguno de los siguientes eventos:
 - a. **Golpe en las patas**: el lateral de las extremidades traseras toca el suelo.
 - b. **Espasmos**: contracciones musculares que inmovilizan la extremidad en una posición extendida o flexionada.
 - c. **Escoliosis**: desviación lateral de la columna vertebral que aparece con forma de "C" en lugar de recta.
 - ii. Inestabilidad media: el animal se mueve tambaleándose y se registran menos de cinco de los eventos descritos anteriormente. También se clasifica como media cuando la pelvis y las patas posteriores sufren caídas repentinas, se mueven violentamente u oscilan de lado a lado. Si la cola está levantada el balanceo de la pelvis y/o de las patas posteriores causan movimientos de lado a lado del tercio más distal de la cola (cola ladeada).
 - iii. Estabilidad normal: ausencia de inclinación o tambaleo del tronco, el tercio más distal de la cola está recta y sin balanceo durante el movimiento. Ausencia de déficits posturales severos y menos de cinco eventos característicos de la inestabilidad media del tronco.
- 7. **Posición de la cola** (*"Tail"*):
 - i. Abajo: la cola toca permanentemente el suelo.
 - ii. Arriba y abajo: la cola se eleva sin tocar el suelo durante el movimiento, aunque en algunas ocasiones llega a tocar el suelo. Basta que la cola toque una vez el suelo para que se considere arriba y abajo en lugar de arriba.
 - iii. Arriba: la cola se encuentra levantada del suelo en todo momento.

Evaluamos las extremidades posteriores de manera independiente. Según la condición alcanzada en cada punto, asignamos un valor diferente en función de una tabla de referencia (ver Tabla M.4). Denominamos *"Score"* al valor medio obtenido de ambos miembros, pudiendo variar entre 0 y 9. El valor 0 indica la total inmovilidad del animal en sus extremidades inferiores, mientras que el valor 9 indica la total y correcta función motora del animal.

Score	Descripción
0	Movimiento del tobillo: nulo.
1	Movimiento del tobillo: ligero.
2	Movimiento del tobillo: extensivo.
3	Apoyo plantar con o sin soporte de peso, - o - Paso dorsal ocasional, frecuente o consistente sin paso plantar.
4	Paso plantar ocasional.
5	Paso plantar frecuente o consistente, sin coordinación - o - Paso plantar frecuente o consistente, con alguna coordinación y patas rotadas en el inicio de contacto y en la salida (R/R).
6	Paso plantar frecuente o consistente, con alguna coordinación y patas paralelas en el inicio de contacto (P/R, P/P) - o - Paso plantar frecuente o consistente, mayormente coordinado y patas rotadas en el inicio de contacto y en la salida (R/R).
7	Paso plantar frecuente o consistente, mayormente coordinado, patas paralelas en el inicio de contacto y rotadas en la salida (P/R) - o - Paso plantar frecuente o consistente, mayormente coordinado y patas paralelas en el inicio de contacto y en la salida (P/P) e inestabilidad severa del tronco.
8	Paso plantar frecuente o consistente, mayormente coordinado, patas paralelas en el inicio de contacto y en la salida (P/P) e inestabilidad media del tronco- o - Paso plantar frecuente o consistente, mayormente coordinado, patas paralelas en el inicio de contacto y en la salida (P/P), estabilidad normal del tronco y cola abajo o arriba y abajo.
9	Paso plantar frecuente o consistente, mayormente coordinado, patas paralelas en el inicio de contacto y en la salida (P/P), estabilidad normal del tronco y cola siempre arriba.

Tabla M.4. Parámetros del test BMS. La tabla define las características asociadas a cada valor de Score en el test BMS.

Realizamos la evaluación siguiendo estrictamente el orden de la escala. Como consecuencia, establecemos un criterio limitante por el cual se descartan, para su evaluación, las condiciones posteriores a la primera condición no alcanzada. Al ser una escala restrictiva, parte de la información referente al estado del animal no se considera en su cálculo. Esta información, sin embargo, se encuentra contemplada en una escala complementaria llamada “Subscore” que considera los siguientes parámetros:

1. Pasos plantares: frecuente = 0; consistente=1
2. Coordinación: ocasional=1, frecuente=2
3. Posición de las patas: Rotadas = 0; Rotada/paralela = 1; Paralelas = 2
4. Estabilidad del tronco: media = 1; normal= 2
5. Posición de la cola: abajo o arriba-abajo = 0; arriba = 1.

El valor del “Subscore” es la suma de todos los valores analizados, pudiendo variar entre 0 y 11. El valor 0 indica la total inmovilidad del animal mientras que, por el contrario, el valor 11 indica la completa y correcta función de los parámetros analizados.

Rotarod

Este test evalúa la coordinación de la locomoción y el equilibrio del animal basándose en el tiempo que éste es capaz de mantenerse sobre un cilindro rotatorio mientras la velocidad de rotación se incrementa paulatinamente (Jones & Roberts, 1968). Realizamos el ensayo dos veces previas a la operación con el fin de familiarizar a los ratones con el equipo de análisis (Mouse Rotarod #47600; Ugo Basile; Figura M.8). Tras la cirugía, iniciamos la evaluación a los 7dpo, ya que antes el animal prácticamente no puede mantenerse sobre el cilindro. Repetimos el ensayo tres veces por animal, con un descanso mínimo de 5 minutos entre registros. Para los análisis consideramos la replicación con mayor tiempo de permanencia sobre el cilindro para cada animal.

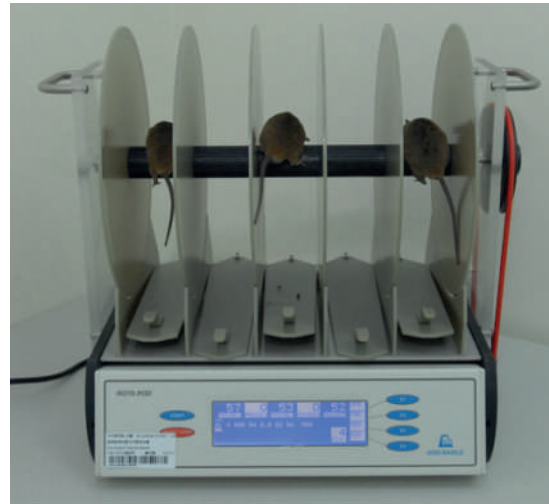


Figura M.8. Rotarod. Aparato empleado para realizar el test Rotarod.

Versamax: Open Field Activity Monitoring system

Este test permite evaluar el comportamiento de un animal en un campo abierto mediante un sistema de monitorización automatizado en el que se registran todos los movimientos del animal en estudio. Estos parámetros son recogidos mediante sensores y reportados como valores numéricos. Los parámetros analizados se detallan en la Tabla M.5.

Evaluación Sensitiva

Además de la función motora, la LME altera la sensibilidad a estímulos externos. Existen diversos ensayos para determinar si el animal experimenta alguna alteración frente a diferentes estímulos de presión y temperatura. A continuación se detallan los ensayos utilizados en la presente tesis:

Test de Von Frey

Este test se desarrolló originalmente por Kim & Chung (1992) para establecer la ausencia o presencia de alodinia⁶ táctil. En este estudio empleamos el procedimiento propuesto por Chaplan y col. (Chaplan, 1994) para determinar el umbral donde se produce un 50% de respuesta a estímulos táctiles (*50% response threshold*). En este test se utilizan filamentos de grosor específico (filamentos de Von Frey; Touch Test™, Soelting Co.) que ejercen una fuerza definida (en gramos) tras doblarse. Además de su grosor y gramos fuerza, cada filamento tiene asociado un valor denominado “Handle Marking” (M) que corresponde al logaritmo en base 10 de diez veces la fuerza en miligramos ($M = \log_{10}(10 \times F_{mg})$). Este valor se denomina en diversos artículos como la fuerza en unidades logarítmicas y mantiene una diferencia de valores aproximadamente constante entre filamentos consecutivos.

Antes de realizar las lesiones, analizamos a los mismos individuos en dos ocasiones para establecer los valores umbral en condiciones fisiológicas. Posteriormente realizamos las evaluaciones semanalmente con un criterio de exclusión: no analizamos los animales incapaces de soportar el peso con sus extremidades posteriores.

⁶**Alodinia:** sensación de dolor ante un estímulo indoloro.

Código	Características destacables
HACTV	Número de interrupciones en el sensor horizontal durante el tiempo de registro.
TOTDIST	Distancia recorrida por el animal.
MOVNO	Número de movimientos en horizontal. Se consideran movimientos distintos aquellos con una diferencia temporal mayor de un segundo.
MOVTIME	Tiempo que el animal está deambulando. No incluye el tiempo de estereotipias.
RESTIME	Diferencia entre el tiempo del ensayo y el tiempo que el animal está en movimiento.
VACTV	Número de interrupciones en el sensor vertical durante el tiempo de registro.
VMOVNO	Número de veces que el animal se mantiene sobre sus patas traseras, levantando las delanteras.
VTIME	Tiempo que el ratón se mantiene erguido sobre sus patas traseras.
STRNO	Cuando el animal interrumpe un sensor repetidamente, el sistema considera que el animal presenta estereotipias. Número de veces que el sistema detecta estereotipias durante el ensayo.
STRTIME	Tiempo total que el animal experimenta estereotipias.
STRCNT	Número de interrupciones en el sensor que ocurren durante el tiempo de estereotipias.
CWREV	Número de veces que el animal gira en sentido horario. El diámetro dibujado deberá ser mayor de cinco centímetros.
CCWREV	Número de veces que el animal gira en sentido anti-horario. El diámetro dibujado deberá ser mayor de cinco centímetros.
MRGDIST	Distancia que recorre el animal mientras está en los laterales o en las esquinas de la jaula.
MRGTIME	Tiempo que tarda el animal en aproximarse 1cm a las paredes de la jaula.
CTRDIST	Distancia que recorre el animal mientras está en el centro de la jaula.
CTRTIME	Tiempo que el animal se encuentra separado de las paredes de la jaula.
LFTIME	Tiempo que el animal se mantiene en la parte delantera izquierda de la jaula.
RFTIME	Tiempo que el animal se mantiene en la parte delantera derecha de la jaula.
LRTIME	Tiempo que el animal se mantiene en la parte trasera izquierda de la jaula.
RRTIME	Tiempo que el animal se mantiene en la parte trasera derecha de la jaula.
TIME	Hora del día en la que se registra el ensayo.
DATE	Fecha en la que se registra el ensayo.

Tabla M.5. Parámetros medidos con el test Versamax. La tabla define las abreviaturas de los parámetros medidos en el test Versamax.

El protocolo seguido para la determinar la sensibilidad mecánica fue el siguiente:

1. Colocar el ratón sobre una malla que nos permita el acceso a la superficie plantar. Impedir que el animal se escape colocándole encima una caja transparente o algún objeto similar y mantenerlo sobre la malla unos 10-15 minutos para minimizar el nivel de estrés del animal, familiarizándolo con la situación.
2. Seleccionar un rango de 8 filamentos de grosor creciente para llevar a cabo el ensayo. En nuestro caso seleccionamos los filamentos de 0,02, 0,04, 0,07, 0,16, 0,4, 0,6, 1,0 y 1,4 g (gramos fuerza). El motivo de esta selección particular es no emplear filamentos muy gruesos porque, superando el 10% del peso del animal serían capaces de levantar la pata del animal independientemente de su respuesta, con los consiguientes errores de inter-

- pretación. Por tanto, realizamos la selección a partir del filamento mayor, 1,4 gramos, que corresponde a aproximadamente un 5-10% del peso del animal.
3. Determinar la presencia o ausencia de respuesta ante un determinado filamento, presionando con él sobre la región palmar de la extremidad posterior izquierda del ratón durante un máximo de seis segundos. De acuerdo con Chaplan y sus colaboradores (1994), consideramos como respuesta positiva que el animal retire la pata o se la lleve a la boca durante contacto con el filamento.
 4. Para establecer el umbral de respuesta del 50% empleamos el método *up & down* de Dixon (1980) de la siguiente manera: iniciamos la evaluación presentando el filamento de 0,16g (en la mitad de la serie seleccionada). Si el animal no muestra una respuesta, procedemos con el siguiente filamento de mayor grosor (0,4g). Si, por el contrario, el animal muestra una respuesta, aplicamos el filamento siguiente de menor grosor (0,07g). Proseguimos con este procedimiento, aplicando grosores mayores si hay respuesta y menores si no la hay, para generar un patrón de respuestas con el que establecer el patrón de respuesta. El cálculo del umbral de respuesta del 50% requiere hasta 4 medidas, si es posible, tras establecer el umbral de sensibilidad (OX o XO; siendo X= respuesta y O= no respuesta) Si no se alcanza el umbral, se continúa la evaluación hasta llegar al filamento de máximo o mínimo grosor. Una vez terminada la evaluación, se tabula el patrón de respuestas positivas y negativas según se explica en el ejemplo ilustrativo. A partir de ese patrón calculamos el umbral de respuesta del 50% empleando la siguiente fórmula: $50\% \text{ threshold (en gramos fuerza)} = 10^{X_t + K\delta} / 10000$; donde X_t = valor de fuerza en unidades logarítmicas (M) del último filamento registrado (ver Tabla M.6), K = coeficiente correspondiente al patrón respuesta registrado (ver Tabla M.7) y δ = diferencia media entre los valores de M consecutivos de los filamentos empleados para cada animal. Los valores de umbral que se obtienen son discontinuos, por tanto, realizamos su análisis estadístico mediante técnicas no paramétricas.

Ejemplo ilustrativo: Un ratón experimenta respuesta con un filamento de Von Frey de 0,16g en ausencia de patología. A los 7 días tras la lesión medular, comenzamos aplicando el filamento de 0,16g sin existir respuesta alguna (O). Continuamos con el filamento de 0,4g; sin respuesta (OO). Tampoco detectamos respuesta ante el filamento de 0,6g (OOO), pero sí con el de 1,0g (OOOX). Este punto marca la estimación inicial del umbral y, de acuerdo con el método *up & down* de Dixon (1980), procedemos a tomar 4 medidas adicionales para estimar con precisión suficiente el umbral del 50% de respuestas. Dado que ante el último estímulo el animal sí mostró una respuesta, volvemos al filamento anterior, es decir, 0,6g. El animal no responde (OOOXO). Repetimos con el filamento de 1,0g y el animal retira la pata (presenta respuesta). El patrón hasta ahora es: OOOXOX. Repetimos con el filamento de 0,6g y 1,0g pero en este

Fuerza (g)	Tamaño (M)	Fuerza (g)	Tamaño (M)
0,008	1,65	4	4,54
0,02	2,36	6	4,74
0,04	2,44	8	4,93
0,07	2,83	10	5,07
0,16	3,22	15	5,18
0,4	3,61	26	5,46
0,6	3,84	60	5,88
1	4,08	100	6,1
1,4	4,17	180	6,45
2	4,31	300	6,65

Tabla M.6. Valores del factor X_t . La tabla muestra las equivalencias entre la fuerza (g) de los filamentos de Von Frey y el tamaño (M), correspondiente al factor X_t . Los valores sombreados en gris corresponden al rango de filamentos empleados en los análisis.

caso no registramos respuesta con ninguno de los dos filamentos (000X0X00). Como se han completado las cuatro valoraciones posteriores al umbral (en negrita). El registro completo es, por tanto: 000X0X00. Los valores a determinar son: $X_t = 4,08$ (M correspondiente al filamento 1,0g, el último registrado en el patrón de respuesta; Tabla M.6); $k = 0,04$ (ver Tabla M.7). Dado que $\delta = 0,24$, el valor umbral del 50% de respuesta según la fórmula umbral 50% = $10^{X_t + k\delta} / 10000$, sería $10^{4,08 + 0,04 \cdot 0,24} = 1,23g$.

Pattern	Value for k	Pattern	Value for k	Pattern	Value for k	Pattern	Value for k
OX	-0.5	000X0000	-0.547	XO	0.5	XXXXXXXX	0.547
00X	-0.388	0000X0000	-0.547	XXO	0.388	XXXXOXXXX	0.547
000X	-0.378	0X000X	-1.25	XXXO	0.378	XOXXXX	1.25
0000X	-0.377	00X000X	-1.247	XXXXO	0.377	XXOXXXXO	1.247
OXO	0.842	000X000X	-1.246	XOX	-0.842	XXXXOXXXXO	1.246
00XO	0.89	0000X000X	-1.246	XXOX	-0.89	XXXXOXXXXO	1.246
000XO	0.894	0X00XO	0.372	XXXXOX	-0.894	XOXXXX	-0.372
0000XO	0.894	00X00XO	0.38	XXXXOX	-0.894	XXOXXXX	-0.38
OXX	-0.178	000X00XO	0.381	XOO	0.178	XXXXOXXXX	-0.381
00XX	0	0000X00XO	0.381	XXOO	0	XXXXOXXXX	-0.381
000XX	0.026	0X00XX	-0.169	XXXXO	-0.026	XOXXXX	0.169
0000XX	0.028	00X00XX	-0.144	XXXXOO	-0.028	XXOXXXX	0.144
OXOO	0.299	000X00XX	-0.142	XOXX	-0.299	XXXXOXXXX	0.142
00XOO	0.314	0000X00XX	-0.142	XXOXX	-0.314	XXXXOXXXX	0.142
000XOO	0.315	OXOXXO	0.022	XXXXOXX	-0.315	XOXXXX	-0.022
0000XOO	0.315	00XOXXO	0.039	XXXXOXX	-0.315	XXOXXXX	-0.039
OXOX	-0.5	000XOXXO	0.04	XOXO	0.5	XXXXOXXXX	-0.04
00XOX	-0.439	0000XOXXO	0.04	XXOXO	0.439	XXXXOXXXX	-0.04
000XOX	-0.432	OXOXXO	-0.5	XXXXOXO	0.432	XOXXXX	0.5
0000XOX	-0.432	00XOXXO	-0.458	XXXXOXO	0.432	XXXXOXXXX	0.458
OXXO	1	000XOXXO	-0.453	XOOX	-1	XXXXOXXXX	0.453
00XXO	1.122	0000XOXXO	-0.453	XXOOX	-1.122	XXXXOXXXX	0.453
000XXO	1.139	OXOXXO	1.169	XXXXOXX	-1.139	XOXXXX	-1.169
0000XXO	1.14	00XOXXO	1.237	XXXXOXX	-1.14	XXOXXXX	-1.237
OXXX	0.194	000XOXXO	1.247	XOOO	-0.194	XXXXOXXXX	-1.247
00XXX	0.449	0000XOXXO	1.248	XXOOO	-0.449	XXXXOXXXX	-1.248
000XXX	0.5	OXOXXX	0.611	XXXXOXX	-0.5	XOXXXX	-0.611
0000XXX	0.506	00XOXXX	0.732	XXXXOXX	-0.506	XXXXOXXXX	-0.732
OXOOO	-0.157	000XOXXX	0.756	XOXXX	0.157	XXXXOXXXX	-0.756
00XOOO	-0.154	0000XOXXX	0.758	XXOXXX	0.154	XXXXOXXXX	-0.758
000XOOO	-0.154	OXOXXX	-0.296	XXXXOXXX	0.154	XOXXXX	0.296
0000XOOO	-0.154	00XOXXX	-0.266	XXXXOXXX	0.154	XXOXXXX	0.266
OXOXX	-0.878	000XOXXX	-0.263	XOXXO	0.878	XXXXOXXXX	0.263
00XOXX	-0.861	0000XOXXX	-0.263	XXOXXO	0.861	XXXXOXXXX	0.263
000XOXX	-0.86	OXOXXO	-0.831	XXXXOXXO	0.86	XOXXXX	0.831
0000XOXX	-0.86	00XOXXO	-0.763	XXXXOXXO	0.86	XXOXXXX	0.763
OXOXO	0.701	000XOXXO	-0.753	XOXX	-0.701	XXXXOXXXX	0.753
00XOXO	0.737	0000XOXXO	-0.752	XXOXX	-0.737	XXXXOXXXX	0.752
000XOXO	0.741	OXOXXO	0.831	XXXXOXX	-0.741	XOXXXX	-0.831
0000XOXO	0.741	00XOXXO	0.935	XXXXOXX	-0.741	XXOXXXX	-0.935
OXOXX	0.084	000XOXXO	0.952	XOXXO	-0.084	XXXXOXXXX	-0.952
00XOXX	0.169	0000XOXXO	0.954	XXOXXO	-0.169	XXXXOXXXX	-0.954
000XOXX	0.181	OXOXXO	0.296	XXXXOXXO	-0.181	XOXXXX	-0.296
0000XOXX	0.182	00XOXXO	0.463	XXXXOXXO	-0.182	XXXXOXXXX	-0.463
OXXOO	0.305	000XOXXO	0.5	XOXXO	-0.305	XXXXOXXXX	-0.5
00XXOO	0.372	0000XOXXO	0.504	XXOXXO	-0.372	XXXXOXXXX	-0.504
000XOO	0.38	OXOXXO	0.5	XXXXOXXO	-0.38	XOXXXX	-0.5
0000XOO	0.381	00XOXXO	0.648	XXXXOXXO	-0.381	XXXXOXXXX	-0.648
OXXOX	-0.305	000XOXXO	0.678	XOXXO	0.305	XXXXOXXXX	-0.678
00XXOX	-0.169	0000XOXXO	0.681	XXOXXO	0.169	XXXXOXXXX	-0.681
000XXOX	-0.144	OXOXXO	-0.043	XXXXOXXO	0.144	XOXXXX	0.043
0000XXOX	-0.142	00XOXXO	0.187	XXXXOXXO	0.142	XXXXOXXXX	-0.187
OXXXO	1.288	000XOXXO	0.244	XOXXO	-1.288	XXXXOXXXX	-0.244
00XXXO	1.5	0000XOXXO	0.252	XXOXXO	-1.5	XXXXOXXXX	-0.252
000XXXO	1.544	OXOXXO	1.603	XXXXOXXO	-1.544	XOXXXX	-1.603
0000XXXO	1.549	00XOXXO	1.917	XXXXOXXO	-1.549	XXXXOXXXX	-1.917
OXXXX	0.555	000XOXXO	2	XOXXO	-0.555	XXXXOXXXX	-2
00XXXX	0.897	0000XOXXO	2.014	XXXXOXXO	-0.897	XXXXOXXXX	-2.014
000XXXX	0.985	OXOXXO	0.893	XXXXOXXO	-0.985	XOXXXX	-0.983
0000XXXX	1	00XOXXO	1.329	XXXXOXXO	-1	XXXXOXXXX	-1.329
OXOOO	-0.547	000XXXXX	1.465	XOXXXX	0.547	XXXXOXXXX	-1.465
00XOOO	-0.547	0000XXXXX	1.496	XXOXXXX	0.547	XXXXOXXXX	-1.496

Tabla M.7. Valores del factor K. La tabla muestra los valores del factor K para cada patrón de respuestas obtenido en la evaluación comportamental. Extraído de Chaplan et al. (1994).

Test de la placa caliente

La sensibilidad térmica incluye las respuestas provocadas tanto por estímulos de frío como de calor. El test de la placa caliente permite determinar si el animal presenta hiperalgesia⁷ frente a un estímulo de calor (Łuszczki, 2010). Para ello utilizamos una placa metálica a +52°C (AHP-1202CPHC; TECA thermoelectric) sobre la que se deposita el animal, midiendo el tiempo en el que tarda en producirse una respuesta (saltar o llevarse la pata a la boca). En el caso de no producirse respuesta antes de los 20 segundos se retira al animal de la placa para evitar posibles daños.

Test de la acetona

Este modelo permite determinar si el animal experimenta alodinia frente a un estímulo de frío provocado al contacto con acetona (Jaggi & Singh, 2013). Para ello, y con ayuda de una jeringa, se aplica una gota (~100µL) de acetona (Fisher Chemical; #A/0600/17) en la región palmar de las extremidades inferiores y se mide el tiempo que tarda en producirse la respuesta.

PROCEDIMIENTOS *IN VITRO*

LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS Y SU MANTENIMIENTO

Para la presente tesis utilizamos la línea celular de neuroblastoma murino (de ratón) Neuro2a (N2a) (ATCC® CCL-131™). El medio de mantenimiento usado fue DMEM (Gibco® by Life technologies™; #41965-039) suplementado con 10% (v/v) de FBS (Gibco® by Life technologies™; #10270) y 1% (v/v) de P/S (Gibco® by Life technologies™; 15140-122). Las células fueron cultivadas en un incubador (NUAIRE™ DH Autoflow) con una temperatura constante de 37°C y un 5% de CO₂. Para garantizar la óptima viabilidad de los cultivos celulares, en todos los casos utilizamos células con un número de pases inferior a 16.

El protocolo seguido para el mantenimiento de la línea celular fue el siguiente:

1. Sembrar aproximadamente 2,2 millones de células en una placa p100 (Corning; #430167).
2. A los 2-3 días, cuando las células cubren aproximadamente el 80% de la superficie de la placa, levantar las células mecánicamente con el propio medio de cultivo y la ayuda de una micropipeta de 1mL.
3. Recoger las células en un tubo estéril de 15mL y centrifugar durante 3min a 1000g.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender cuidadosamente las células en 4mL de DMEM suplementado.
5. En una placa nueva, diluir 1mL de la dilución obtenida en 9mL de DMEM suplementado.

Para congelar las células, las levantamos y centrifugamos (del mismo modo descrito previamente para el mantenimiento de la línea celular) y, seguidamente, las resuspendimos en FBS suplementado con un 5% de DMSO hybri-max® (Sigma; #D2650) y las congelamos utilizando viales Cryotube™ (Thermo Scientific; #377224). Congelamos, en primer lugar, a -20°C y, tres horas después, a -80°C para evitar que una congelación demasiado acelerada pudiera dañar las células.

⁷Hiperalgesia: aumento anormal de la sensibilidad ante un estímulo doloroso.

Para descongelar las células, preparamos una placa p100 con 9mL de DMEM suplementado. Descongelamos las células a 37°C durante el tiempo mínimo para que comenzase la descongelación (aprox. 1 min) y volcamos las células sobre la placa p100. Evitamos manipular con pipeta, ya que en este punto las células son muy sensibles.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)

El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) es un compuesto amarillo, soluble y permeable a la membrana celular. En el interior de la célula, la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa reduce el MTT a formazán (ver Figura M.9), un compuesto insoluble de color azul intenso que puede ser cuantificado mediante un ensayo colorimétrico. La capacidad de la célula para reducir MTT ha sido interpretada como un indicador del estado redox celular (Altman, 1974; Shearman *et al.*, 1995), de la integridad mitocondrial (Berridge & Tan, 1993; Rago *et al.*, 1991) y de la proliferación celular y la citotoxicidad (Mosmann, 1983).

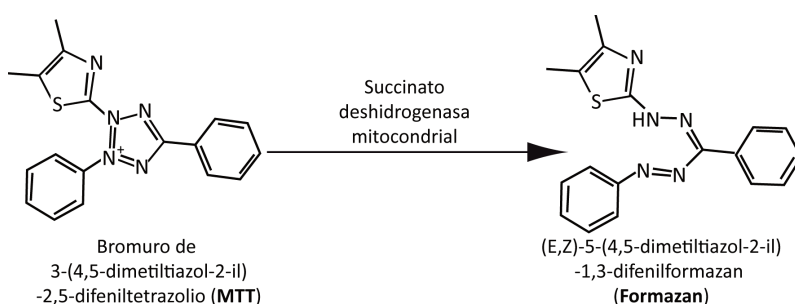


Figura M.9. Estructura molecular del MTT y del formazán. La imagen muestra la estructura molecular del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y del 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan, el producto colorimétrico obtenido tras la reducción del MTT.

Disoluciones empleadas

MTT: MTT (Sigma; #M5655) 5mg/mL diluido en PBS (Fisher Scientifics; #1210) estéril.

Ácido acético 80% (v/v): ácido acético glacial (Sigma; #A6283). Diluir en agua destilada.

HCl 1N: HCl 12N (Sigma; #30721). Diluir en agua destilada.

Tampón de lisis: combinar los siguientes reactivos:

Reactivo	Casa comercial	#Catálogo	Cantidad
SDS	Sigma	L3771	2g
DMF	Sigma	D4551	5mL
Ácido acético al 80%	-	-	250μL
HCl 1N	-	-	250μL
*Nota: Disolver primero el SDS y el DMF en agua destilada, calentando. Agregar el resto de reactivos y enrasar hasta un volumen final de 10mL.			

Tabla M.8. Tampón de lisis para MTT. La tabla muestra los reactivos, las características comerciales y las cantidades empleadas para la preparación del tampón de lisis para el ensayo de viabilidad celular, MTT.

Procedimiento

El procedimiento seguido se basó en una modificación del protocolo original descrito por Hansen y col. (1989). En todos los casos, los experimentos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos (p96), estériles, transparentes y de fondo plano (Costar®; Corning Incorporated; #3596). A continuación se detalla el protocolo utilizado:

1. Añadir 10μL de MTT a 5mg/mL a cada pocillo.
2. Mantener en incubación a 37°C y un 5% de CO₂ durante tres horas.

3. Adicionar 100µL del tampón de lisis a cada pocillo. **Nota: Calentar al baño María o a 37°C el buffer de lisis antes de añadirlo.*
4. Mantener a 37°C y oscuridad durante toda la noche.
5. Leer a una longitud de onda de 550nm en una lectora de placas (Infinite M200; Tecan).

TÉCNICAS MOLECULARES

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS

La concentración de esfingolípidos en muestras de médula espinal, sangre y suero, procedentes de animales lesionados y sin lesionar, fue determinada por la técnico Eva Dalmau y las Dras. Josefina Casas y Gemma Fabriàs del Instituto de Química Orgánica Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC) empleando cromatografía líquida de ultra resolución asociada a espectrometría de masas (*Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*; UPLC-MS).

Materiales utilizados

KOH 1M: KOH (Sigma; #P1767). Diluir en metanol (Sigma; #32213).

Ácido acético 1M: ácido acético glacial (Sigma; #A6283). Diluir en H₂O.

Estándares internos: Cer C12 (#LM2212); SM C12 (#LM2312); GluCerC12 (#LM2511); Sph C17 (#LM2000) y S1P C17 (#LM2144) adquiridos a la compañía Avanti Polar Lipids.

Extracción de muestras

El protocolo seguido para la extracción de muestras de sangre y suero fue el siguiente:

1. Anestesiarse al ratón con 20µL de pentobarbital (Dolethal; Vetoquinol S.A) y confirmar la ausencia de reflejos. La evaluación de reflejos se puede hacer pinzando las extremidades inferiores o el extremo distal de la cola.
2. Colocar al ratón en posición decúbito supino sobre una tabla inclinada (30° aprox.) y sujetar las extremidades con cinta adhesiva para fijar su posición.
3. Sujetar parte de la piel del pecho con unas pinzas y retirarla con ayuda de unas tijeras, exponiendo la musculatura.
4. Pinzar el esternón, levantar ligeramente y hacer una incisión por debajo de la apófisis xifoides con ayuda de unas tijeras. El objetivo de este paso es crear una cavidad que permita sujetar directamente la apófisis xifoides con unas pinzas.
5. Abrir la caja torácica continuando el corte hasta, aproximadamente, la altura de las axilas.
6. Cortar el diafragma y levantar la caja torácica, fijándola con unas pinzas Halsted para exponer los distintos órganos.
7. Extraer la sangre lentamente mediante punción cardíaca en el ventrículo izquierdo utilizando una aguja de 23G (BD Microlance™ 3; # 300800) acoplada a una jeringa de 1mL (BD Plastipak™; #300013), ambas estériles.
8. Desacoplar la aguja de la jeringa para reducir el riesgo de hemólisis y transferir 100µL de sangre a un tubo estéril de 1,5mL y congelar a -80°C hasta su análisis.
9. Pasar el resto de la muestra a un tubo estéril de 1,5mL y dejarla coagular a R/T durante 45min.
10. Centrifugar a 3400xg durante 10min a R/T.

11. Extraer el sobrenadante (suero), transferirlo a un tubo estéril de 1,5mL y congelar a -80°C hasta su análisis.

Para la extracción de médula espinal realizamos una laminectomía siguiendo el protocolo descrito en el apartado “Modelo murino de LME por contusión: procedimiento quirúrgico” (Pasos: 2 y 5-13) hasta tener expuesta la médula espinal entre las vértebras T8 y T10. Cortamos las raíces ventrales con unas microtijeras, extrajimos la sección comprendida entre las vértebras T8-T10 y lavamos la muestra en PBS con el fin de eliminar posibles restos de sangre. Secamos la muestra depositándola suavemente sobre un papel absorbente, la transferimos a un tubo estéril de 1,5mL y la congelamos a -80°C hasta su análisis.

Procedimiento

El protocolo empleado para la extracción de esfingolípidos fue el siguiente:

1. Añadir a la muestra 100µL de H₂O_{mQ}. Si se trata de una muestra líquida (sangre o plasma) pasar directamente al paso 2.
2. Adicionar 500µL de metanol (Fisher Scientifics; #A456) y pasar a un vial de vidrio.
3. Añadir 250µL de cloroformo (Fisher Chemical; #C/4920/21).
4. Agregar 20µL de una solución de estándar internos de esfingolípidos (20µM; 200pmoles/muestra).
5. Añadir 5µL de S1P C17 (20µM; 100pmol/muestra).
6. Disgregar la muestra mediante ultrasonidos hasta dispersión utilizando un sonicador (Bandelin; Sonoplus HD 2070).
7. Incubar toda la noche a 48°C y agitación a 350rpm (Eppendorf; Themomixer Comfort).
8. Atemperar las muestras a 37°C.
9. Añadir 75µL de KOH 1M en MeOH y sonicar durante 1min.
10. Incubar a 37°C durante 2horas.
11. Añadir 75µL de ácido acético 1M.
12. Evaporar el disolvente en una corriente de N₂ o, alternativamente, utilizar un sistema speed-vac (SpeedVac SPD 111V; Thermo Electron Corporation) y congelar las muestras a -20°C o -80°C hasta su análisis.
13. Resuspender con 500µL de metanol y transferir a tubos eppendorfs.
14. Evaporar el disolvente en una corriente de N₂ o, alternativamente, utilizar un sistema speed-vac.
15. Resuspender en 150µL de metanol
16. Centrifugar a 10.000rpm durante 3min y transferir 130µL a un vial para UPLC.
17. Inyectar al equipo de UPCL (Waters LCT Premier Orthogonal Accelerated Time of Flight Mass Spectrometer; Waters).

Las condiciones empleadas para el análisis mediante UPLC-MS fueron las siguientes:

Muestra inyectada: 10µL.

Flujo: 0,3mL/min.

Modo de ionización ESI: positivo.

Columna: Acquity UPLC BEH C8 1.7 μ m (2.1 x 100mm) (Waters; #186002878)

Fase A: 1mM Formiato amónico (31mg; Sigma; #09735) + 0,2% Ácido fórmico (1mL; Merck; #100264) + MeOH (500mL).

Fase B: 2mM Formiato amónico (62mg) + 0,2% Ácido fórmico (1mL) + H₂O (500mL).

Gradiente: 0 min, 80% A; 3 min, 90% A; 6 min, 90% A; 15 min, 99% A; 18 min, 99% A; 20 min, 80% A.

Análisis de los resultados

Los datos procedentes del análisis mediante UPLC-MS fueron adquiridos mediante el *software* de análisis MassLynx™ MS (Waters) y analizados empleando Microsoft Excel y R.

MONITORIZACIÓN DE MÚLTIPLES REACCIONES

Utilizamos la monitorización de múltiples reacciones (*Multiple Reaction Monitoring; MRM*) para analizar simultáneamente la concentración de varias proteínas en una misma muestra. A diferencia de la MS tradicional, que intenta detectar todas las proteínas existentes en una muestra biológica, la MRM está destinado a identificar específicamente péptidos predefinidos, permitiendo aumentar la sensibilidad de la detección. Para ello, se realizan diversos estudios bioinformáticos que permiten determinar los péptidos teóricos obtenidos tras la tripsinización de las proteínas diana (péptidos tripticos), cuáles de ellos son únicos de la proteína en estudio (proteotípicos). A partir de los péptidos

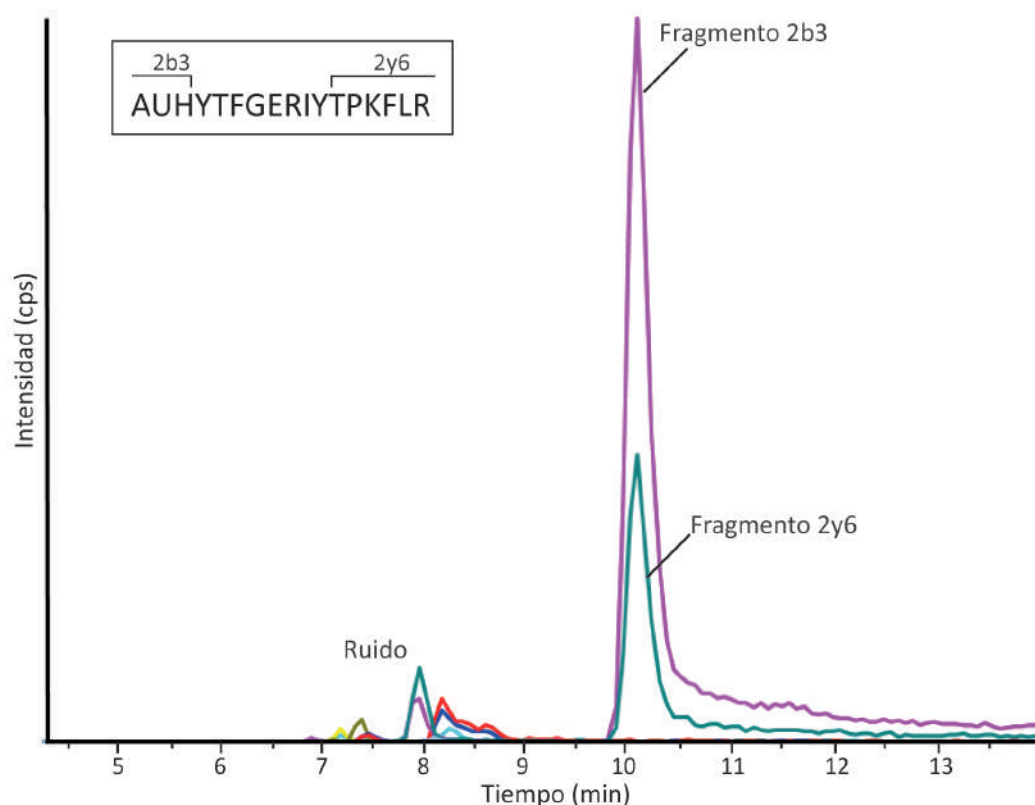


Figura M.10. Identificación y cuantificación de péptidos mediante MRM. El recuadro superior de la imagen muestra, a modo de ejemplo, un péptido y dos de sus fragmentos (2b3, 2y6). El número previo a la letra indica la carga del fragmento. En el cromatograma se ejemplifican los picos cromatográficos para cada uno de los fragmentos. Esta área será empleado para cuantificar la abundancia de la transición péptido>fragmento. La elución de los dos fragmentos en un mismo tiempo de retención garantiza la identificación correcta del péptido en estudio.

proteotípicos, se identifican dos o más fragmentos iónicos que serán detectados, junto con el péptido (denominado precursor), en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. El par compuesto por el precursor y cada uno de los fragmentos iónicos seleccionados se conoce como transición. La estimación de la concentración de la proteína en estudio se basa en el análisis de estas transiciones, de forma que la masa del precursor sirve como filtro en el primer analizador de masa (1er cuadrupolo) y, la del fragmento iónico sirve como filtro en el segundo analizador (3er cuadrupolo) para su posterior detección y cuantificación.. El área del fragmento, obtenida a partir de su cromatograma, se emplea para cuantificar la abundancia de la transición (Figura M.10). Las transiciones y las condiciones de análisis teóricas (energías de colisión, tiempos,) definidas a partir de los estudios bioinformáticos se validan en una muestra análoga a las muestras objeto de estudio (es recomendable suplementar la muestra con proteína pura o péptidos marcados isotópicamente) y, tras optimizar los parámetros, se realiza el análisis de las muestras y el tratamiento de datos (Figura M.11).

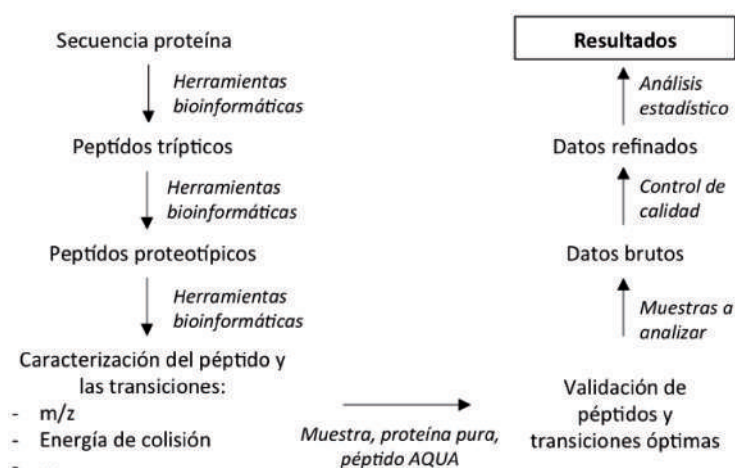


Figura M.11. Análisis mediante MRM. En la imagen se muestran, esquemáticamente, los pasos seguidos para llevar a cabo el análisis mediante el monitoreo de múltiples reacciones.

Extracción y preparación de las muestras

La extracción de médula espinal para su análisis mediante MRM es análoga a la descrita para el análisis de esfingolípidos (ver apartado: Determinación de la concentración de esfingolípidos; extracción de muestras). Una vez extraída y lavada en PBS, preparamos la muestra para su análisis según el siguiente protocolo:

1. Homogeneizar mecánicamente con ayuda de un homogeneizador o "potter" en 300µL de tampón RIPA (Sigma; #R0278) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche; #11873580001).
2. Incubar en hielo durante 30min.
3. Centrifugar a 4°C durante 15-30 minutos a 12.000xg.
4. Extraer el sobrenadante y transferirlo a un tubo estéril de 1,5mL.
5. Congelar las muestras a -20°C hasta su análisis o bien continuar con el siguiente paso.
6. Incubar con 100mM de ditiotreitól (Fluka; #43817) en 50mM de bicarbonato amónico (Scharlau; AM03300500) durante 30 minutos a 37°C.
7. Adicionar 550mM de iodoacetamida (Sigma; #11149) en 50mM de bicarbonato amónico e incubar durante 20 minutos a R/T.
8. Añadir 50mM de bicarbonato amónico, acetonitrilo al 15% (Scharlau; #AC03102500) y tripsina (Promega; V5111) en un ratio final de 1µg tripsina:50µg proteína.

9. Incubar O/N a 37°C.
10. Añadir ácido fórmico al 2% (Fluka; #94318-F) y limpiar las muestras con Pep-Clean spin columns (Pierce; #4889870) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
11. Secar las muestras en *speed vac* (SpeedVac SPD 111V; Thermo Electron Corporation) y resuspender en acetonitrilo al 2% y ácido fórmico al 2% antes del análisis.

Secuencias seleccionadas para MRM

Las responsables de la Unidad de proteómica del Hospital Nacional de Paraplégicos, donde se llevó a cabo el análisis mediante MRM, diseñaron los péptidos y transiciones teóricas de SRM (*Selected Reaction Monitoring*) usando el *software* MRMpilot v2.1 (ABSciex) y considerando los siguientes parámetros:

- El péptido debe ser único de la proteína en estudio (proteotípico).
- El péptido tiene que tener una longitud entre 6 y 25 aminoácidos.
- Los dos extremos del péptido deben corresponder a sitios de corte enzimático con tripsina, es decir, deben ser extremos trípticos (arginina (R) o lisina (K) sin prolina (P) a continuación).
- Se deben evitar sitios de corte perdido (*missed cleavage sites*) y los aminoácidos con modificaciones frecuentes, en particular, cisteínas que puedan ser modificadas (carbamido-metiladas) por el tratamiento previo al análisis.
- Se seleccionan, preferentemente, los iones “y” (ver Figura M.10) con mayor relación m/z para evitar posibles artefactos debidos al disolvente y la columna.
- Una vez seleccionadas las transiciones, se procede a la optimización de los parámetros de análisis de cada transición con el objetivo de maximizar la señal de respuesta (sensibilidad). Posteriormente, se establecen los parámetros definitivos del ensayo de MRM (Tabla M.9).

Procedimiento

Para el análisis mediante MRM utilizamos un sistema de LC-MS/MS formado por un cromatógrafo TEMPO nano LC (Applied Biosystems) acoplado a un cuadrupolo modificado (Applied Biosystems 4000 QTRAP LC/MS/MS System), controlados mediante el *software* Analyst v.1.4.5.

Injectamos cada muestra por triplicado (4µL conteniendo 8µg de proteína), usando como fase móvil A (2% acetonitrilo/98% agua y 0,1% ácido fórmico) con una velocidad de flujo de 10µL/min durante 5min. Cargamos los péptidos en una pre-columna (µ-precolumn Cartridge, Acclaim Pep Map 100 C18, 5 µm, 100Å; 300 µm i.d. X 5mm, LC Packings) para concentrar y desalinizar las muestras. Usamos una columna C18 (Onyx Monolithic C18, 150 x 0.1mm I.D., Phenomenex) para llevar a cabo la cromatografía de fase reversa en un gradiente de fase A y fase B (98% acetonitrilo, 2% agua, 0,1% ácido fórmico). Eluimos las muestras utilizando un flujo de 900nL/min según los siguientes pasos: 2%-15%B en 2 min, 15%-30% B en 18 min, 30%-50% B en 5 min, 50%-90% B en 2 min y por último, 90% B durante 3 min. Regeneramos las columnas con un fase B al 5% durante 15 min adicionales.

Para este análisis utilizamos el espectrómetro de masas operando en modo ion positivo con un voltaje de spray iónico de 2800V y una temperatura de 150°C. Optimizamos la energía de colisión para obtener la máxima eficiencia de transmisión y sensibilidad por cada transición de SRM. Monitoriza-

Proteína		Número de acceso (GenBank)	Secuencia proteotípica	Q ₁ (m/z)	Q ₃ (m/z)	Energía de colisión (eV)	Tiempo dwell (ms)	Carga del ión	Fragmento analizado
Esfingosina-1-fosfato Quinasa 1		Q8CI15	GLLPRPCR	484,78	284,20	26,3	40	+2	b3
					685,36	26,0	40	+2	y5
					798,44	26,0	40	+2	y6
			MEPVECPR	509,23	358,14	27,4	40	+2	b3
746,28	27,4	40			+2	b6			
432,20	27,4	40			+2	y3			
Esfingosina-1-fosfato Quinasa 2		Q9JIA7	LSYLPATTEPALPIGHSLPR	744,08	793,44	41,2	40	+3	y15(2+)
					828,96	41,2	40	+3	y16(2+)
					609,35	41,2	40	+3	y5
			GVPLSGDQEITPELLPR	910,99	254,15	45,6	40	+2	b3
		272,17			45,6	40	+2	y2	
724,44	45,6	40			+2	y6			
Esfingosina-1-fosfato Fosfatasa 1		Q9JI99	ITIPLACK	458,27	538,36	25,2	40	+2	b5
					609,40	25,2	40	+2	b6
					588,32	25,0	40	+2	y5
			NSLTGEEGELVK	638,32	359,27	33,1	40	+2	y3
		545,33			33,1	40	+2	y5	
246,18	33,6	40			+2	y2			
Esfingosina-1-fosfato Fosfatasa 2		Q810K3	WPRPSFPPVVR	446,59	373,26	26,3	40	+3	y3
					714,43	26,3	40	+3	y6
					801,46	26,3	40	+3	y7
Esfingosina-1-fosfato liasa		Q8R0X7	AGYPLEKPFDFR	720,37	437,21	36,7	40	+2	y3
					584,28	36,7	40	+2	y4
					681,34	36,7	40	+2	y5
			TLPAQGMGTAEVLER	786,91	1190,58	39,6	40	+2	y11
1062,53	40,1	40			+2	y10			
874,46	40,1	40			+2	y8			
Esfingosina-1-fosfato Receptor 1		O08530	YITMLK	384,72	260,20	21,9	50	+2	y2
					277,15	21,9	50	+2	b2
					492,29	22,0	50	+2	y4
			LTPAQWFLR	566,32	621,35	29,9	50	+2	y4
749,41	30,0	50			+2	y5			
917,50	30,0	50			+2	y7			
Esfingosina-1-fosfato Receptor 2		P52592	ETLDMQETTSR	655,80	464,25	33,9	40	+2	y4
					593,29	33,9	40	+2	y5
					852,39	34,0	40	+2	y7
			EGSAFITLSASVFSLLAIAIER	765,76	417,25	42,3	40	+3	y3
		488,28			42,3	40	+3	y4	
785,49	42,3	40			+3	y7			
Esfingosina-1-fosfato Receptor 3		Q9Z0U9	EHYDYVGK	505,73	545,20	27,3	40	+2	b4
					581,29	27,3	40	+2	y5
					744,36	27,0	40	+2	y6
			LVCGCLVK	474,75	373,19	28,0	40	+2	b3
359,27	28,0	40			+2	y3			
736,35	28,0	40			+2	y6			
Esfingosina-1-fosfato Receptor 4		Q9Z0L1	TFQLSPVHWFLR	510,95	249,12	26,6	40	+3	b2
					288,20	26,6	40	+3	y2
					621,35	26,6	40	+3	y4
			ITEAHSGASTDSSLRPR	629,32	215,14	35,5	40	+3	b2
		415,22			35,5	40	+3	b4	
830,45	35,5	40			+3	y7			
Esfingosina-1-fosfato Receptor 5		Q91X56	CLPPTLDR	486,25	274,12	26,9	80	+2	b2
					698,38	26,9	80	+2	y6
					349,70	26,9	80	+2	y6(2+)
			LSPALWFAR	530,80	692,39	28,0	80	+2	y5
		430,74			28,4	80	+2	y7(2+)	
860,48	28,9	80			+2	y7			
Hemoglobina	Subunidad alfa	P01942	TYFPHFDVSHGSAQVK	910,44	1174,59	45,0	10	+2	y11
	Subunidad beta	P02088	LHVDPENFR	563,79	1408,70	45,0	10	+2	y13
					662,33	30,0	5	+2	y5
Albúmina sérica		P07724	YNDLGEQHFK	625,79	876,42	30,0	5	+2	y7
					745,36	33,0	10	+2	y6
					973,47	33,0	10	+2	y8
			APQVSTPTLVEAAR	720,40	856,49	37,0	2	+2	y8
1044,57	36,7	2			+2	y10			
Tubulina		Q9CWF2			FPGQLNADLR	565,80	492,27	30,4	5
			886,47	30,4			5	+2	y8
			LAVNMVPFPR	572,32	516,29	30,7	5	+2	y4
					615,36	30,7	5	+2	y5

Tabla M.9. Parámetros empleados para el análisis mediante MRM. La tabla muestra una lista de las proteínas analizadas mediante MRM, su código de acceso para GenBank (y UniProt) y los fragmentos proteotípicos seleccionados para cada proteína así como sus respectivas transiciones y los parámetros de análisis establecidos. Q1 y Q3 = cuadrupolo 1 y 3, respectivamente; CE = energía de colisión; Tiempo Dwell = tiempo de permanencia en la cámara.

mos un total de 96 transiciones de MRM en cada análisis, cada una adquirida con una resolución unitaria (*unit resolution*) tanto en Q1 como en Q3 y un tiempo de permanencia en cámara (*dwell time*) de 2-100ms, resultando en ciclos de 4,2747s para el análisis completo.

Análisis de resultados

Antes de proceder al análisis de los datos, evaluamos la existencia de isoformas en las proteínas estudiadas empleando las bases de datos: “Uniprot” (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) y “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Según estas bases de datos, la SphK1 presenta tres isoformas (Q8CI15-1, Q8CI15-2 y Q8CI15-3). La diferencia entre ellas afecta únicamente al inicio de la secuencia, coincidiendo con uno de los péptidos analizados (MEPVECPR) pero sin afectar al otro (GLLPRPCR). No se han descrito isoformas en *Mus musculus* para las demás proteínas analizadas en el presente estudio.

Control de calidad (I): relación señal/ruido

Para determinar aquellos picos claramente diferenciables del ruido inespecífico, decidimos establecer un límite de detección (LOD) mayor de 3 ($S/R \geq 3$) y un límite de cuantificación (LOQ) mayor de 10 ($S/R \geq 10$). Estos parámetros son ampliamente utilizados y su uso está aceptado en la legislación que controla la concentración de contaminantes en alimentos (Varga *et al.*, 2012). Establecimos la medida del ruido de acuerdo con los estudios realizados por Zhang *et al.* (2011) que considera un rango de ruido ± 10 veces el tiempo de retención del péptido evaluado (Figura M.12) y determinamos la relación señal/ruido (S/R) re-analizando los cromatogramas de los individuos sin lesión medular. Este análisis permite establecer la línea base de detección de las distintas proteínas analizadas en ausencia de lesión. Asimismo, analizamos también la relación S/R para uno de los triplicados de un individuo lesionado (1dpo), minimizando así las posibilidades de descartar un péptido que aumente notablemente tras la LME pero no sea fácilmente identificable en ausencia de lesión medular.

Control de calidad (II): tiempos de retención

Una vez seleccionadas aquellas transiciones con un nivel de detección óptimo, llevamos a cabo el control de calidad de las medidas según los tres métodos propuestos por Chung *et al.* (2014) con algunas modificaciones.

El primero considera los tiempos de retención de las distintas transiciones. El tiempo de retención de un fragmento peptídico está determinado por su composición de aminoácidos, por lo que los fragmentos análogos deben eluir a tiempos similares en los distintos análisis. La existencia de diferencias en la elución de estos fragmentos puede deberse a errores sistemáticos, como el orden de análisis, o a errores no sistemáticos cuyo desencadenante es un factor indeterminado. La desviación

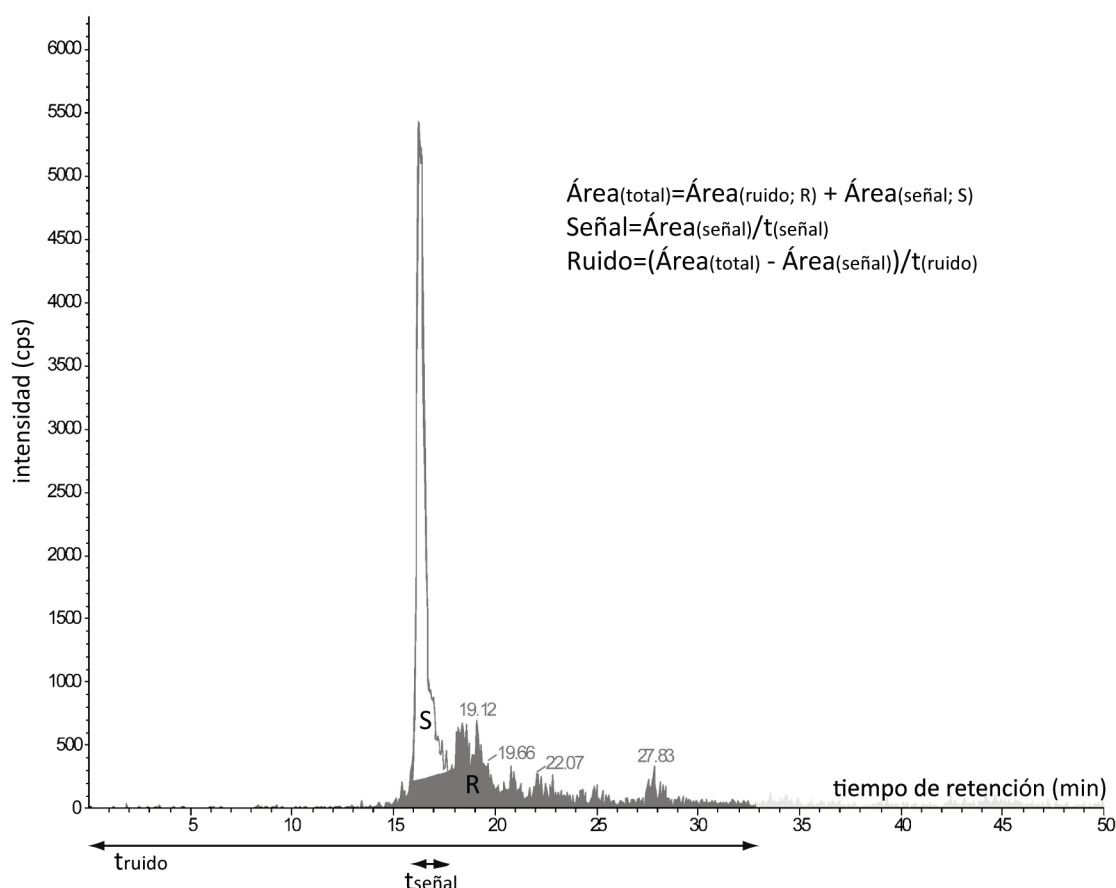


Figura M.12. Relación señal/ruido. En el cromatograma mostrado en la imagen se señalan el área correspondiente a la señal (S) y al ruido (R), así como los tiempos de retención establecidos para el análisis de la relación S/R considerando: $t(\text{ruido}) = \pm 10 \times t(\text{señal})$. Cps= cuentas por segundo; min = minutos.

de los tiempos de retención no explicada por errores sistemáticos permite evaluar la precisión de las medidas realizadas. Para identificar anomalías en la elución de los analitos no debidas a errores sistemáticos, empleamos los coeficientes de variación (C.V.) de los tiempos de retención de cada transición, considerando como réplicas los valores de los distintos individuos de un mismo grupo.

Organización de los datos: para realizar este control de calidad organizamos la información en tres archivos:

- **transicion.txt:** contiene la información sobre el nombre de la proteína en estudio, el péptido y la transición analizada. La información deberá estar ordenada en columnas y en la primera fila deberá aparecer el nombre correspondiente a los datos de esa columna. La Tabla M.10 muestra a modo de ejemplo el modelo de organización necesario.
- **RT.csv:** contiene los datos de tiempo de retención de las distintas proteínas a analizar considerando cada columna como uno de los triplicados del análisis de cada individuo, encabezado por el nombre del individuo (el nombre debe comenzar por una letra, no por un número; ver Tabla M.11). Las filas contemplan los datos de las distintas transiciones en el mismo orden que el recogido en el archivo “transition.csv”.
- **Area.csv:** la información debe estar organizada de manera similar al archivo RT.csv.

Proteína	Péptido	Analito	Transición
S1PR1	YITMLK	S1PR1_YITMLK.2y2	4
S1PR1	YITMLK	S1PR1_YITMLK.2b2	5
S1PR1	YITMLK	S1PR1_YITMLK.2y4	6
SGPP2	WPRPSFPPVVR	SGPP2_WPRPSFPPVVR.3y3	7

Tabla M.10. Modelo del archivo “transición.txt” para el control de calidad. La tabla muestra la organización de datos del archivo “transition.txt” empleado para llevar a cabo los análisis utilizando el software R según las instrucciones descritas en el presente apartado.

X418_1	X418_2	X418_3	X417_1
7,96	8,11	8,13	7,89
8,03	8,14	8,16	7,95
8,03	8,14	8,17	7,96
6,96	7,1	7,14	6,94

Tabla M.11. Modelo del archivo “RT.csv” para el control de calidad. La tabla muestra la organización de datos del archivo “transition.txt” empleado para llevar a cabo los análisis utilizando el software R según las instrucciones descritas en el presente apartado.

Además, es necesario descargar las librerías “lattice”, “MASS”, “affy”, “limma” y “preprocessCore” disponibles, respectivamente, en las siguientes direcciones web: <https://cran.r-project.org/web/packages/lattice/index.html>;

<https://cran.r-project.org/web/packages/MASS/index.html>;

<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/affy.html>;

<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>;

<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/preprocessCore.html>, e instalarlas en R (Paquetes>Instalar paquetes a partir de archivos .zip locales...).

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R se encuentra detallada en la Tabla M.12.

Control de calidad (III): transiciones inconsistentes

El último análisis empleado para la identificación de transiciones inconsistentes se basa en el método RMA (*Robust Multichip Analysis*) empleado en el análisis de microarrays. Este método permite descomponer los valores de cada transición de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\log_2(\text{área del pico})_{ij} = \text{media } \log_2(\text{área del pico})_j + \text{efecto de la transición } i + \text{error } ij$$

dónde: i=transición i; j=muestra j.

Los efectos de la muestra y la transición se estiman mediante una aproximación robusta que establece un peso para cada transición en cada muestra. Estos pesos se pueden definir como la diferencia entre la tendencia general de las transiciones y la tendencia de cada transición individual. Estos pesos varían entre 0 y 1; donde los valores más altos indican una mayor consistencia del pico de una transición con el patrón general. Como consecuencia, este parámetro se puede utilizar como estimación de la calidad de cada pico individual.

Comando	Acción
- Control de calidad (II) basado en el tiempo de retención -	
<code>transition.info<-read.table("transition.txt", header=TRUE)</code>	Carga el archivo "transition.txt". Header=TRUE indica que las columnas tienen cabecera.
<code>RT<-read.csv2("RT.csv", header=TRUE)</code>	Carga el archivo "RT.csv" reconociendo los decimales separados por "," y lo transforma a "."; formato requerido.
<code>RT<-as.matrix(RT)</code>	Reconoce el archivo "RT" como una matriz de datos.
<code>Area<-read.csv2("Area.csv", header=TRUE)</code>	Carga el archivo "RT.csv" reconociendo los decimales separados por "," y lo transforma a "."; formato requerido.
<code>Area<-as.matrix(Area)</code>	Reconoce el archivo "Area" como una matriz de datos.
<code>library(lattice)</code>	Carga la librería citada.
<code>library(MASS)</code>	Carga la librería citada.
<code>library(affy)</code>	Carga la librería citada.
<code>library(limma)</code>	Carga la librería citada.
<code>library(preprocessCore)</code>	Carga la librería citada.
<code>med.RT <- apply(RT, 1, median, na.rm = TRUE)</code>	Calcula el valor mediana de los tiempos de retención. "1" indica este cálculo se realiza para cada fila (transición).
<code>dev.RT <- RT - med.RT</code>	Calcula una matriz nueva con la desviación de cada medida en función de su valor mediana, es decir, "valor"- "mediana").
<code>df.RT <- stack(as.data.frame(dev.RT))</code>	Dispone los datos calculados para "dev.RT" en una única columna.
<code>df.RT\$med.RT <- rep(med.RT, ncol = dev.RT)</code>	Calcula la resta entre la matriz original y "dev.RT".
<code>med.factor <- apply(RT, 2, median, na.rm = TRUE) - median(RT, na.rm = TRUE)</code>	Calcula la mediana de cada análisis (columna) de "RT" menos la mediana de toda la matriz "RT".
<code>adj.RT <- t(t(RT) - med.factor)</code>	Calcula la resta entre los valores de la matriz "RT" y el valor med.factor
<code>adj.RT.CV <- apply(adj.RT, 1, function(x){sd(x, na.rm = TRUE)/mean(x, na.rm = TRUE)})</code>	Calcula el coeficiente de variación de cada transición (fila) de la matriz "adj.RT", es decir: "desviación estándar/promedio"
<code>RT.CV <- apply(RT, 1, function(x){sd(x, na.rm = TRUE)/mean(x, na.rm = TRUE)})</code>	Calcula el coeficiente de variación de cada transición (fila) de la matriz "RT", es decir: "desviación estándar/promedio"
<code>CV.comp<-RT.CV-adj.RT.CV</code>	Calcula la resta los datos indicados.
<code>QC.RT.result <- data.frame(transition.info, "CVraw" = RT.CV, "CVadj" = adj.RT.CV, "CVraw-CVadj" = CV.comp, "med.RT" = med.RT, dev.RT)</code>	Crea el objeto "data.frame" "QC.RT.result" incorporando los datos especificados.
<code>write.table(QC.RT.result, "QC.RT.txt", sep = "\t", col.names = TRUE, row.names= FALSE, quote= FALSE)</code>	Crea un archivo .txt con los resultados obtenidos.

Tabla M.12. Control de calidad (II). La tabla detalla el código utilizado para llevar a cabo la identificación de tiempos de retención anómalos empleando el software R.

Organización de los datos: se emplean los ficheros ya cargados en el control de calidad (II), anteriormente descrito.

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

- Control de calidad (III) basado en el peso de las transiciones -	
Comando	Acción
log2.area <- stack(as.data.frame(log2(Area)))	Organiza la información de área de los picos, nombre de proteína, péptido y transición en un objeto "data.frame". Añade las celdas necesarias para incorporar posteriormente los datos calculados.
log2.area\$Sample <- as.character(log2.area\$ind)	
log2.area\$Protein <- rep(transition.info\$Protein, ncol(Area))	
log2.area\$Peptide <- rep(transition.info\$Peptide, ncol(Area))	
log2.area\$Transition <- rep(transition.info\$Transition, ncol(Area))	
log2.area\$wts <- rep(NA, nrow(log2.area))	
pep.id <- unique(log2.area\$Peptide)	Identifica los péptidos analizados.
n.peps <- length(pep.id)	Determina el número de péptidos analizados.
for(i in (1:n.peps)){ sub <- subset(log2.area, Peptide == pep.id[i]) sub <- subset(sub, lis.na(values)) m1 <- rlm(formula=values ~ as.factor(Sample) + as.factor(Transition), data=sub, maxit = 1000) sub\$wts <- m1\$w log2.area[rownames(sub) ,]\$wts <- sub\$wts}	Genera un bucle para calcular los pesos de cada transición y análisis.
wts.matrix <- matrix(log2.area\$wts, nr = nrow(Area), nc = ncol(Area), dimnames = list(rownames(Area), paste(colnames(Area), "weights", sep= " _")))	Genera una matriz con los pesos calculados para cada transición y análisis.
med.wts <- apply(wts.matrix, 1, median, na.rm = TRUE)	Calcula el valor mediana del peso de cada transición (filas).
q1.wts <- apply(wts.matrix, 1, quantile, probs = 0.25, na.rm = TRUE)	Calcula el cuartil 1 (25%) de los pesos de cada transición.
q3.wts <- apply(wts.matrix, 1, quantile, probs = 0.75, na.rm = TRUE)	Calcula el cuartil 3 (75%) de los pesos de cada transición.
iqr.wts <- q3.wts - q1.wts	Calcula el rango intercuartílico de los pesos de cada transición.
QC.Weights.result <- data.frame(transition.info, "Median.Fragment.Weights" = med.wts, "IQR.Fragment.Weights" = iqr.wts, wts.matrix)	Crea el objeto "data.frame" "QC.Weights.result" incorporando los datos especificados.
write.table(QC.Weights.result, "QC.Weights.txt", sep = "\t", col.names = TRUE, row.names= FALSE, quote= FALSE)	Crea un archivo .txt con los resultados obtenidos.

Tabla M.13. Control de calidad (III). La tabla detalla el código utilizado para llevar a cabo la identificación de transiciones inconsistentes empleando el software R.

Control de calidad (IV): réplicas inconsistentes

El análisis basado en RMA también permite estimar diferencias entre las réplicas de un mismo individuo. En este caso se emplea el parámetro NUSE (*Normalized Unscaled Standard Error*), desarrollado para analizar la calidad de los datos de las muestras. La mediana de los valores NUSE de todos los péptidos analizados en cada replicación de una muestra debe variar alrededor de 1, de forma que podemos identificar las replicaciones anómalas como aquellas que se desvían de este valor (diferencia superior al 5% según Chung *et al.*, 2014).

Organización de los datos: continuar el análisis iniciado en los controles de calidad (II y III), anteriormente descritos.

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

- Control de calidad (IV) basado en el peso de las muestras (NUSE) -	
Comando	Acción
<code>WW <- apply(wts.matrix, 2, function(x, ind){ tapply(x, ind, sum, na.rm = TRUE) }, ind = transition.info\$Peptide)</code>	Genera una matriz con la suma de los pesos de las distintas transiciones de un mismo péptido por cada análisis.
<code>WW <- 1/sqrt(WW)</code>	Genera una matriz con el valor de "1/(raíz cuadrada de WW)" para cada péptido y análisis.
<code>med.WW <- apply(WW, 1, median, na.rm = TRUE)</code>	Calcula la mediana de los valores obtenidos de cada péptido (filas).
<code>nuse <- (WW)/med.WW</code>	Genera una matriz con el valor de "WW/(mediana de WW)" para cada péptido y análisis.
<code>NUSE.summary <- data.frame("Median" = apply(nuse, 2, median), "IQR" = apply(nuse, 2, function(x){ quantile(x, 0.75) - quantile(x, 0.25)}))</code>	Crea el objeto "data.frame" "NUSE.summary" incorporando los datos especificados.
<code>write.table(NUSE.summary, "NUSE_for_sample_quality.txt", sep = "\t", col.names = TRUE, row.names= TRUE, quote= FALSE)</code>	Crea un archivo .txt con los resultados obtenidos.

Tabla M.14. Control de calidad (IV). La tabla detalla el código utilizado para llevar a cabo la identificación de réplicas inconsistentes empleando el software R.

Normalización de los datos

Para la normalización de los datos decidimos emplear el sistema propuesto por Chung y sus colaboradores basado en la relativización frente a una proteína de mantenimiento (*housekeeping proteins*). En nuestro caso, empleamos la proteína β -tubulina, cuya expresión no se ve afectada por la lesión medular (Liu & Xu, 2006).

Organización de los datos: continuar el análisis iniciado para los controles de calidad anteriormente descritos.

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

- Cálculo de la matriz normalizada -	
<code>log2.area.matrix <- log2(Area)</code>	Calcula el \log_2 de los datos de la matriz "Area".
<code>subset.ind <- which(transition.info\$Protein == "TUBB")</code>	Identifica las transiciones de la proteína normalizadora "TUBB".
<code>med.factor <- apply(log2.area.matrix[subset.ind,], 2, median, na.rm = TRUE) - median(log2.area.matrix[subset.ind,], na.rm = TRUE)</code>	Calcula el valor de la diferencia entre la mediana de las transiciones de la tubulina en cada análisis (X) y la mediana total de X.
<code>normed.area <- t(t(log2.area.matrix) - med.factor)</code>	Calcula la matriz de datos normalizados.
<code>normed.area.df <- data.frame(transition.info, normed.area)</code>	Crea el objeto "data.frame" "normed.area.df" incorporando los datos especificados.
<code>write.table(normed.area.df, "Normalized_TUBB.G3P.txt", col.names = TRUE, row.names = FALSE, quote = FALSE, sep= "\t")</code>	Crea un archivo .txt con los resultados obtenidos.

Tabla M.15. Normalización de datos. La tabla detalla el código utilizado para llevar a cabo la normalización de los datos empleando el software R.

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS (BCA)

Realizamos la cuantificación de la concentración total de proteínas de cada muestra empleando el kit comercial de BCA (Pierce Thermo Fisher; #23227). El método de BCA se basa en la combinación de la reacción de Biuret –la reducción del ión Cu^{2+} al ión Cu^+ en medio alcalino- con la detección altamente sensible y selectiva de los iones Cu^+ usando un reactivo que contiene ácido bicinónico (BCA). La proteína posibilita la reducción de los iones Cu^{2+} a Cu^+ , mientras que la quelación de dos moléculas de BCA por cada ión Cu^+ produce la coloración violeta característica de este ensayo. Este complejo soluble en agua presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 562nm. La absorbancia aumenta de forma prácticamente lineal con el incremento de concentración de proteínas hasta un rango de 2mg/mL. Referimos la concentración de proteínas a un estándar de albúmina de suero bovino (BSA). En detalle, el protocolo es el siguiente:

1. Realizar diluciones seriadas de BSA para obtener la serie de concentraciones: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015 y 0,007 mg/mL, además de una muestra blanco (sin BSA).
**Nota: Realizar las diluciones en el mismo tampón de lisis de las muestras a analizar.*
2. En una placa P96 transparente y de fondo redondo (FisherBrand®; #FB56422), cargar 10µL/pocillo de muestra; tanto en el caso de la recta de BSA como de las muestras problema.
3. Preparar la mezcla del ensayo según las siguientes ecuaciones:
 - Reactivo B (µL; es la disolución de Cu^{2+})
 $B = (\text{número de pocillos} \times 200\mu\text{L})/51$
 - Reactivo A (mL; es el medio alcalino para la reacción de Biuret)
 $A = (\text{número de pocillos} \times 200\mu\text{L}) - B$

4. Mezclar las disoluciones A y B (mezcla A+B) y añadir 200µL/pocillo.
5. Mantener a 37°C en oscuridad durante 30 minutos.
6. Medir la absorbancia a una longitud de onda de 562nm.
7. Ajustar la relación absorbancia/concentración de BSA a una recta y obtener la ecuación de ajuste.
8. Estimar las concentraciones de las muestras según la ecuación de ajuste obtenida, teniendo en cuenta multiplicar por el factor de dilución en el caso de haber diluido las muestras problema. La absorbancia de las muestras a analizar deberá estar dentro del rango lineal de la recta patrón; en caso contrario, será necesario repetir diluyendo la muestra problema.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS (SDS-PAGE) E INMUNOMARCADO (WESTERNBLOT)

Realizamos la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS según el método discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Tras realizar la electroforesis, empleamos el método de Harlow y Lane (1988) para la electrotransferencia desde el gel de poliacrilamida a una membrana en la que detectamos la proteína de interés mediante inmunomarcado (*western blot*; *WB*). Para el inmunomarcado utilizamos anticuerpos específicos (anticuerpos primarios) que reconocen epítopos de la proteína de interés y, posteriormente, anticuerpos secundarios específicos de isotipo y especie del primario y que están conjugados con peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*) para su posterior detección. Por último, empleamos la detección quimioluminiscente para la obtención de los resultados en una película fotográfica o mediante un equipo específico de detección.

Anticuerpos y disoluciones utilizadas

Anticuerpos primarios						
Anticuerpo	Origen	Tipo	Casa comercial	#Catálogo	Dilución	RRID
SPL	Conejo	Policlonal	Sta. Cruz Biotechnology	Sc-67368	1:200	AB_2301852
β-tubulina	Ratón	Monoclonal	Sigma-Aldrich	T5293	1:5000	AB_477580
β-actina	Ratón	Monoclonal	Sigma-Aldrich	A5441	1:5000	AB_476744
Anticuerpos secundarios						
Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa			Thermo Fisher	#31460	1:5000	AB_228341
Anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa			Thermo Fisher	#31430	1:5000	AB_228307

Tabla M.16. Listado de anticuerpos empleados. La tabla muestra los anticuerpos primarios y secundarios empleados en esta tesis, la especie en la que han sido generados (origen), el tipo de anticuerpo, la casa comercial, el número de catálogo y la dilución empleada. RRID= Código del registro de anticuerpos.

- **Tris 1,5M pH=6,8:** Trizma base (Sigma; #T1503). Diluir en agua destilada. Ajustar el pH a 6,8 con HCl 12N (Sigma; #30721). Filtrar la disolución.
- **SDS al 10% o 20% (p/v):** SDS (Sigma; #L37771). Diluir en agua destilada.
- **Tris 1,5M pH 8,8:** Trizma base (Sigma; #T1503). Diluir en agua destilada. Ajustar el pH a 8,8 con HCl 12N (Sigma; #30721). Filtrar la disolución.
- **APS al 10% (p/v):** Persulfato amónico (Sigma; #A3678). Diluir en agua destilada.

- **Tampón de carga 4x (Loading Buffer 4x):** mezclar los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 1,5M pH 6,8	1,3mL
SDS 20%	4,0mL
Glicerol (Sigma; #G7893)	2,7mL
Azul de bromofenol (USB; #12370)	~1 mg
β -Mercaptoetanol* (Sigma; #M7154)	200 μ L/alícuota
*Nota: Hacer alícuotas de 800 μ L de la mezcla sin β -mercaptoetanol y congelar a -20°C. Antes de utilizar la alícuota añadir 200 μ L de β -mercaptoetanol.	

Tabla M.17. Tampón de carga. La tabla muestra los reactivos y las cantidades empleadas para la preparación del tampón de carga 4x.

- **Tampón para la separación electroforética 10x (Running Buffer 10x):** mezclar los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Trizma base (Sigma; #T1503)	30,3g
Glicina (Fisher Scientifics; #BP381-5)	144,1g
SDS (Sigma; #L37771)	50g
*Nota: Diluir, en primer lugar, la mezcla Trizma-glicina. Después añadir el SDS y enrasar la dilución a un volumen final de 1L con agua destilada. Usar a concentración 1x diluyendo en agua destilada.	

Tabla M.18. Tampón para la separación electroforética. La tabla muestra los reactivos y las cantidades empleadas para la preparación del tampón para la separación electroforética 10x.

- **Tampón para la transferencia de proteínas 10x (Transfer Buffer 10x):** mezclar los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Trizma base (Sigma; #T1503)	30,3g
Glicina (Fisher Scientifics; #BP381-5)	144,1g
Enrasar la disolución a un volumen final de 1L con agua destilada. Usar a concentración 1x diluyendo en agua destilada.	

Tabla M.19. Tampón para la electrotransferencia. La tabla muestra los reactivos y las cantidades empleadas para la preparación del tampón para la transferencia de proteínas 10x.

- **TBS-T 20x:** mezclar los distintos reactivos según la Tabla M.20.

Reactivo	Cantidad
Trizma base (Sigma; #T1503)	193,6g
NaCl (Fluka® Analytical; #71381)	701,28g
KCl 2M (USB; #75896)	120 μ L
Tween®20 (Sigma; #P9416)	80mL
Ajustar el pH a 7,6 con HCl 12N (Sigma; #30721) y enrasar a un volumen final de 4L. Usar a concentración 1x diluyendo en agua destilada.	

Tabla M.20. Disolución de TBS-T. La tabla muestra los reactivos y las cantidades empleadas para la preparación del TBS-T 20x.

- **Leche al 5% (p/v):** leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana) diluida en TBS-T. Filtrar la disolución.
- **Acrilamida/Bis-acrilamida 30%** (Sigma; #A3699)
- **Tampón fosfato 0,5M pH=7,4 (100mL):** preparar las siguientes disoluciones:
 - 1) **0,2M Fosfato potásico monobásico:** pesar 2,72g de fosfato potásico monobásico (Sigma; #P5655) y diluir en 40mL de agua destilada.
 - 2) **0,3M Fosfato potásico dibásico:** pesar 5,22g de fosfato potásico dibásico (Sigma; #P3786) y diluir en 40mL de agua destilada.Mezclar ambas disoluciones y enrasar a 100mL con agua destilada.

Extracción de las muestras

Extracción de muestras de origen in vivo

Empleamos la técnica de SDS-PAGE y WB Para el estudio de la expresión de proteínas extrajimos muestras de timo, cerebelo y médula espinal de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Anestesiarse al ratón con 20µL de pentobarbital (Doletal; Vetoquinol S.A) y confirmar la ausencia de reflejos. La evaluación de reflejos se puede hacer pinzando las extremidades inferiores o el extremo distal de la cola.
2. Colocar al ratón en posición decúbito supino sobre una tabla inclinada (30° aprox.) y sujetar las extremidades con cinta adhesiva para inmovilizar la posición.
3. Sujetar parte de la piel del pecho con unas pinzas y retirarla con ayuda de unas tijeras, exponiendo la musculatura.
4. Pinzar el esternón, levantar ligeramente y hacer una incisión por debajo de la apófisis xifoides con ayuda de unas tijeras. El objetivo de este paso es crear una cavidad que permita sujetar directamente la apófisis xifoides con unas pinzas.
5. Abrir la caja torácica continuando el corte hasta, aproximadamente, la altura de las axilas.
6. Cortar el diafragma y levantar la caja torácica, fijándola con unas pinzas Halsted para exponer los distintos órganos.

Finalizada la toracotomía, procedimos con la extracción de las muestras de timo, cerebelo y médula espinal de acuerdo con los siguientes protocolos:

- **Para la extracción de timo:** una vez expuesta la cavidad torácica, localizar el timo, situado en la región inmediatamente superior al corazón, y extraerlo cuidadosamente con ayuda de unas microtijeras.
- **Para la extracción de cerebelo:** decapitar al animal y realizar un corte sagital en la línea media dorsal craneal, paralela a la médula espinal. Con una pinzas curvas del Nº7 retirar los huesos del cráneo para exponer el cerebro. Extraer la totalidad del cerebro de la cavidad craneal, colocarlo en una placa con PBS y separar el cerebelo.
- **Para la extracción de médula espinal:** realizar una laminectomía siguiendo el protocolo descrito en el apartado “Modelo murino de LME por contusión: procedimiento quirúrgico” (Pasos: 2 y 5-13) hasta tener expuesta la médula espinal entre las vértebras T8 y T10. Cortar las raíces ventrales con unas microtijeras y extraer la sección comprendida entre las vértebras T8-T10.

En todos los casos, lavar la muestra en una placa con PBS y homogeneizarla en 300µL de tampón fosfato 0,5M pH=7,4 suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche; #11873580001) empleando 3 ciclos de 20s de sonicación (Sonoplus HD 2070; Bandelin) con un minuto en hielo entre cada ciclo. Conservar las muestras a -20°C hasta su análisis.

Extracción de muestras procedentes de cultivos celulares Neuro2a (N2a)

El protocolo empleado para la extracción de proteínas de cultivos celulares de N2a cultivadas en una placa P100 y la posterior extracción de proteína total fue el siguiente:

1. Eliminar el medio de cultivo de la placa para descartar el material procedente de células muertas.
2. Añadir 10mL PBS estéril a la placa y levantar las células mecánicamente con ayuda de una pipeta de 1mL para reducir el riesgo de daños.
3. Transferir a un tubo estéril y centrifugar a 1000xg y R/T durante 3min.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular en 300µL de tampón RIPA (Sigma; #R0278) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche; #11873580001).
5. Disgregar mecánicamente la muestra con ayuda de un homogeneizador o “potter”.
6. Incubar en hielo durante 30 minutos.
7. Centrifugar a 12.000xg durante 15-30 minutos a 4°C.
8. Extraer el sobrenadante y conservar a -20°C hasta su análisis.

Procedimiento

El protocolo para el estudio de la expresión proteica consta de cuatro partes: extracción de muestras, separación electroforética, electrotransferencia e inmunomarcado. Los protocolos seguidos fueron los siguientes:

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Llevamos a cabo la separación electroforética de las proteínas de la muestra de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Determinar la concentración proteica de las muestras a analizar según el apartado anteriormente descrito “Medición de la concentración de proteínas (BCA)”.
2. Igualar la concentración de las muestras en estudio diluyéndolas con RIPA.
3. Añadir la cantidad correspondiente de tampón de carga 4x (concentración final: 1x).
4. Hervir las muestras a 99°C durante 3 minutos (sin agitación) y traspasar a hielo inmediatamente después. Las muestras se pueden conservar a -20°C hasta el momento de su análisis.
5. Preparar la solución del gel separador según la Tabla M.21.
6. Añadir 1mL de isopropanol (Sigma; #24137) sobre el frente superior de la solución del gel separador y esperar a que éste polimerice.
7. Eliminar el isopropanol y lavar con agua destilada.
8. Preparar la solución del gel concentrador al 5% según la Tabla M.22, detallada en función del volumen necesario:

Reactivo	Volumen (mL) de reactivo para geles de:							
	5mL	10mL	15mL	20mL	25mL	30mL	40mL	50mL
6%								
H ₂ O	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
30% Acrilamida	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
10% SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
10% APS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	4μL	8μL	12μL	16μL	20μL	24μL	32μL	40μL
8%								
H ₂ O	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
30% Acrilamida	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
10% SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
10% APS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	3μL	6μL	9μL	12μL	15μL	18μL	24μL	30μL
10%								
H ₂ O	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
30% Acrilamida	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
10% SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
10% APS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	2μL	4μL	6μL	8μL	10μL	12μL	16μL	20μL
12%								
H ₂ O	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
30% Acrilamida	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
10% SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
10% APS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	2μL	4μL	6μL	8μL	10μL	12μL	16μL	20μL
15%								
H ₂ O	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
30% Acrilamida	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
10% SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
10% APS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	2μL	4μL	6μL	8μL	10μL	12μL	16μL	20μL

Tabla M.21. Listado de reactivos para la preparación de la solución del gel separador. La tabla muestra las cantidades requeridas de los reactivos para preparar los geles separadores de acrilamida según la concentración y el volumen de mezcla necesario. Sombreado en gris se muestra la mezcla habitual empleada en los estudios de esta tesis. SDS= Dodecil sulfato sódico; APS= persulfato amónico; TEMED= N,N,N,N-Tetrametiletilendiamina. Modificado del protocolo de Harlow y Lane (1988).

Reactivo	Volumen (mL) de reactivo para geles de:							
	1mL	2mL	3mL	4mL	5mL	6mL	8mL	10mL
H ₂ O	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
30% Acrilamida	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
1,5M Tris (pH 6,8)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
10% SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
10% APS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED	1μL	2μL	3μL	4μL	5μL	6μL	8μL	10μL

Tabla M.22. Listado de reactivos para la preparación de la solución del gel concentrador. La tabla muestra las cantidades requeridas de los reactivos para preparar los geles concentradores de acrilamida al 5% según el volumen de mezcla necesario. Sombreado en gris se muestra la mezcla habitual empleada en los estudios de esta tesis. SDS= Dodecil sulfato sódico; APS= persulfato amónico; TEMED= N,N,N,N-Tetrametiletildiamina. Modificado del protocolo de Harlow y Lane (1988).

- Añadir la solución concentradora sobre el gel separador y, seguidamente, fijar el peine del tamaño deseado para crear los pocillos en los que se cargará posteriormente la muestra.
- Una vez polimerizado el tampón concentrador (aprox. 7min.), retirar el peine y lavar los pocillos con agua destilada.
- Introducir el gel en la carcasa correspondiente y ésta en la cubeta donde se llevará a cabo la electroforesis.
- Añadir el volumen necesario de *Running buffer* para llenar la cubeta.
- Cargar el marcador de peso molecular Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher; #Catálogo: 26619) y las muestras en los distintos pocillos.
- Conectar la cubeta (Mini Protean® Tetra cell; Bio-rad) a una fuente de alimentación (Power-Pac™ HC; Bio-rad) programándola a 90V mientras las muestras se igualan en el gel concentrador y, posteriormente, subir a 120V para acelerar la separación de las muestras.
- Mantener la electroforesis hasta separar adecuadamente la región de interés en función del peso molecular de la proteína en estudio.

Tinción de geles con Azul de Coomassie

Para visualizar la presencia de proteínas en los geles de poliacrilamida utilizamos la tinción con azul de Coomassie. Realizamos esta tinción incubando el gel en la solución Page Blue™ Protein Staining (Thermo Scientific; #24620) durante 5 min a R/T y balanceo. A continuación, lavamos con agua destilada para eliminar el exceso de solución de tinción.

Electrotransferencia húmeda

El protocolo seguido fue el siguiente:

- Finalizada la electroforesis, transferir el gel a un recipiente con *Transfer buffer*.
- Incubar en el mismo tampón dos láminas de papel de cromatografía 3MM (Whatman™).
- Activar la membrana de PVDF Immobilon®-P (Millipore; #IPVH00010; tamaño de poro de 0,45μm) en metanol (Sigma; #32213) durante un minuto e incubar en *Transfer buffer*.

4. Humedecer una esponja de electrotransferencia en *Transfer buffer* y colocarla sobre la tapa roja del cartucho (*cassette*).
5. Poner sobre la esponja el papel de cromatografía previamente humedecido en el mismo tampón.
6. Colocar la membrana de PVDF activada.
7. Poner el gel de poliacrilamida sobre la membrana, con cuidado de fijar un punto de referencia (como la posición del marcador) para mantener la orientación adecuada de la carga de muestras.
8. Superponer papel cromatográfico previamente humedecido en *Transfer buffer*.
9. Pasar un rodillo sobre el papel cromatográfico para evitar la presencia de burbujas entre el gel y la membrana.
10. Colocar la otra esponja de electrotransferencia, previamente humedecida en *Transfer buffer* sobre el papel cromatográfico, cerrar el *cassette* y colocarlo en la cubeta de electrotransferencia húmeda (Mini Protean® 3 cell; Bio-rad) con la orientación adecuada (rojo/rojo; negro/negro) para asegurar que el sentido de la corriente eléctrica sea el correcto.
11. Llenar la cubeta con *Transfer buffer*, introducir una barra agitadora magnética y un cartucho con hielo. Colocar la cubeta sobre un sistema de agitación magnética para mantener una temperatura homogénea.
12. Conectar la cubeta de electrotransferencia a una fuente de alimentación (Power-Pac™ HC ; Bio-rad) programándola a 60V durante 95min para la correcta transferencia de la proteína (estas son las condiciones requeridas para la proteína SPL; 63KDa).
13. Continuar con el protocolo para *western blot*.

Inmunomarcado

El protocolo seguido para el inmunomarcado de proteínas después de SDS-PAGE fue el siguiente:

1. Bloquear la membrana incubando con leche al 5% en TBS-T durante una hora a R/T o 30 min a 37°C.
2. Incubar con el anticuerpo primario contra la proteína de interés (ver tabla del apartado “Anticuerpos y disoluciones utilizadas”) disuelto en leche al 5% en TBS-T. Mantener en agitación (balanceo) durante toda la noche a 4°C.
3. Retirar la solución de anticuerpo y lavar la con TBS-T (3x10min) en agitación.
4. Incubar con el anticuerpo secundario (ver tabla del apartado “Anticuerpos y disoluciones utilizadas”) disuelto en leche al 1% en TBS-T. Mantener en agitación durante 90min a R/T.
5. Retirar la solución de anticuerpo y lavar la membrana con TBS-T (3x10min) en agitación.
6. Poner la membrana sobre una lámina de una carpeta de plástico transparente de tamaño adecuado.
7. Incubar la membrana durante un minuto con 2mL de mezcla 1:1 de los componentes del kit de detección quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (Thermo Scientific; #34080).
8. Tapar la membrana con la otra lámina de la carpeta, retirar el exceso de reactivos de detección con un papel y revelar los resultados mediante la exposición de una película fotográfica Amersham Hyperfilm™ ECL (Ge Healthcare; #28906837) en un equipo de

revelado (Reveladora manual; Kodak) o empleando el equipo de escaneo sin película fotográfica Amersham Imager600 (Ge Healthcare).

9. Posteriormente, lavar la membrana con TBS-T (3x10min) en agitación y repetir los pasos 2-7 incubando con el anticuerpo primario contra la proteína normalizadora (β -tubulina) y el anticuerpo secundario requerido conjugado a HRP (ver tabla del apartado “Anticuerpos y diluciones utilizadas”).

Tinción de membranas con Rojo Ponceau S

Para visualizar la presencia de proteínas en membranas de PVDF utilizamos la tinción con rojo Ponceau S (Sigma; #P7170). Realizamos esta tinción incubando el gel en la solución durante 5min a R/T y balanceo. Seguidamente, lavamos con agua destilada hasta eliminar el exceso de solución de tinción.

Análisis de resultados

Para el análisis de los resultados, escaneamos las películas fotográficas empleando el equipo ImageScanner III (GE Healthcare) y el software LabScan 6.0. Posteriormente densitometramos las imágenes obtenidas utilizando el software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014), de acuerdo con el protocolo descrito en detalle en: <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Para determinar los niveles de transcripción de los genes en estudio, realizamos la extracción de ARN total de la muestra y, posteriormente, la retrotranscripción de ARNm a ADN complementario (cADN). Una vez obtenido el cADN llevamos a cabo la amplificación cuantitativa del fragmento mediante qPCR.

Sondas utilizadas

- Sgpl1: Thermo Fisher Scientific; #4331182.
- 18S: Thermo Fisher Scientific; #4333760T.

Extracción de las muestras

Para el estudio de la expresión del gen Sgpl1, extrajimos muestras de timo, cerebelo y médula espinal de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado: Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) e inmunomarcado (Western Blot); Extracción de muestras de origen *in vivo*.

Procedimiento

El protocolo para el estudio de la expresión génica consta de cuatro partes: extracción ARN, tratamiento con ADNs, retrotranscripción a cADN y amplificación del fragmento. Los protocolos seguidos fueron los siguientes:

Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total, una vez obtenida la muestra, la lavamos en una placa con PBS, la secamos cuidadosamente, la pesamos en un tubo de 1,5mL libre de ARNsas (usamos siempre una cantidad menor de 100mg de muestra para evitar la saturación del sistema) y la homogeneizamos con un tissueruptor con 700µL de reactivo QIAzol (QIAzol®, Qiagen; #79306) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez en QIAzol, la muestra se puede congelar (preferiblemente a -80°C) hasta su procesamiento o continuar seguidamente con la extracción de ARN total según el siguiente protocolo:

1. Incubar las muestras homogeneizadas en QIAzol durante 5 min a R/T.
2. Añadir 200µL de cloroformo, tapar y agitar mediante Vortex (Vortex Mixer; Stuart™) a máxima potencia durante 15 segundos.
3. Incubar 2-3 min a R/T.
4. Centrifugar durante 15min a 12.000xg y una temperatura de 4°C.
5. Recoger la fase superior acuosa y transferir a un tubo de 1,5mL libre de ARNsas.
6. Añadir 350µL de alcohol isopropílico (Sigma; #24137), voltear e incubar 10 min a R/T.
7. Centrifugar durante 10min a 12.000xg y una temperatura de 4°C. Eliminar el sobrenadante.
8. Lavar el precipitado con 700µL de etanol al 75%. Agitar mediante Vortex y centrifugar 5 min a 7.500xg y 4°C.
9. Dejar las muestras a R/T hasta que el precipitado se seque completamente.
10. Resuspender en 50µL de H₂O libre de ARNsas (Sigma; #W4502).
11. Cuantificar la concentración de ARN total obtenido mediante espectrofotometría (ND-1000; NanoDrop®).

Tratamiento con ADNsa y retrotranscripción de ARN a cADN

Realizamos el tratamiento de las muestras con ADNsa para asegurar la eliminación de restos de ADN que pudieran contaminar las muestras. Posteriormente, llevamos a cabo la retrotranscripción de ARN a cADN.

Realizamos el tratamiento con ADNsa de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Mezclar en un mismo tubo los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad	Casa comercial	#Catálogo
ARN total obtenido	1,5µg	Paso anterior*	---
Tampón 10X de ADNsa	1,5µL	Roche	04716728002
ADNsa	1,5µL	Roche	04716728001
DTT	0,75µL	Invitrogen	Y00147
Inhibidor de ARNsas	0,75µL	Promega	N211A

Tabla M.23. Tratamiento con ADNsa. La tabla recoge el nombre, las cantidades y las características comerciales de los reactivos empleados para realizar el tratamiento con ADNsa.

2. Llevar hasta un volumen final de 15µl con H₂O_{mQ}.
3. Incubar 30min a 37°C y, posteriormente, durante 3 min a 95°C en un termociclador (MyCycler™ thermal cycler; Bio-Rad).
4. Conservar a 4°C hasta proceder a realizar la retrotranscripción.

A continuación se detalla el protocolo seguido para la retrotranscripción del ARN total de la muestras a cDNA:

1. Combinar en un tubo estéril de 0,2mL:

Reactivo	Cantidad	Casa comercial	#Catálogo
Mezcla tratada con DNAsa	15µL	<i>Paso anterior*</i>	---
Tampón de transcriptasa	6µL	Invitrogen	Y02321
MgCl ₂ 50mM	1,5µL	Biotoools	20.036-4184
dNTPs 10mM	3µL	Biotoools	20.031-4179
Primers degenerados	1,5µL	Roche	11034731001
Transcriptasa inversa del virus de leucemia murina Moloney	1,5µL	Invitrogen	28025-043
H ₂ O libre de ARNsas	1,5µL	Ambión	Y00147

Tabla M.24. Retrotranscripción del ARN. La tabla muestra el nombre, las cantidades y las características comerciales de los reactivos empleados para realizar la retrotranscripción del ARN a cADN.

2. Incubar en el termociclador durante 60 min a 37°C y, posteriormente, 3min a 95°C.
3. Congelar las muestras a -80°C hasta realizar la qPCR o mantener a 4°C si continuamos el protocolo en el mismo día.

PCR semicuantitativa (qPCR)

Para llevar a cabo la PCR semicuantitativa de los genes Sgpl1 y 18S utilizamos sondas Taqman® de Applied Biosystems, las cuales permiten visualizar la amplificación de los segmentos analizados en tiempo real gracias a su estructura y a la forma en la que actúan. Estas sondas están formadas por:

1. Un grupo emisor de fluorescencia (FAM™) en el extremo 5'-terminal.
2. Un grupo no fluorescente y aceptor de energía (*nonfluorescent quencher*; NFQ), en el extremo 3'-terminal.
3. Una molécula MGB (*minor Groove binder*) unida junto al NFQ del extremo 3'-terminal. Esta molécula MGB incrementa la tempera de unión (T_m) sin necesidad de aumentar la longitud de la sonda permitiendo el diseño de sondas más cortas.

La Figura M.13. ilustra los dos posibles estados en los que se puede encontrar una sonda Taqman® durante el ensayo:

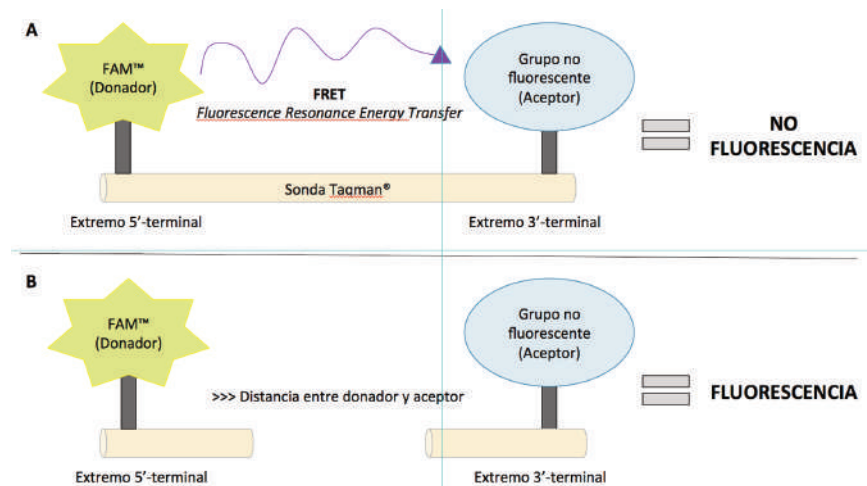


Figura M.13. Fundamento teórico del funcionamiento de las sondas Taqman. La figura ilustra el mecanismo de funcionamiento de las sondas Taqman® empleadas para la visualización a tiempo real de la amplificación de los fragmentos de ADN.

Al tratarse de sondas de escaso tamaño, cuando la sonda se encuentra intacta (Figura M.13.A.) la proximidad entre el grupo emisor de fluorescencia (FAM™) del extremo 5-terminal y el grupo aceptor no fluorescente (“*non fluorescent quencher, NFQ*”) del extremo 3'-terminal permite el fenómeno físico de transferencia de energía resonante fluorescente (*FRET; Fluorescence Resonance Energy Transfer*). En ausencia de la secuencia diana, la sonda se mantiene intacta, de modo que no se registra emisión de fluorescencia. En presencia de la secuencia diana, la sonda intacta unida a la diana es cortada por la actividad 5'-nucleasa de la Taq ADN polimerasa en el paso de extensión de la PCR (Figura M.13.B), de modo que:

1. La distancia entre el grupo emisor y el grupo aceptor de fluorescencia de la sonda aumenta impidiendo que se produzca el fenómeno FRET. Así pues, es posible registrar la fluorescencia emitida por el grupo fluorescente.
2. Se elimina la sonda de la hebra diana, permitiendo que la extensión continúe sin interferir en el desarrollo de la PCR.
3. El incremento de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto amplificado, ya que en cada ciclo se liberan las moléculas fluorescentes al ser cortadas de sus respectivas sondas.

Para la amplificación de los fragmentos de interés, llevamos a cabo el siguiente protocolo:

1. Mezclar los siguientes reactivos en un tubo de 0,2mL para PCR:

Reactivo	Cantidad	Casa comercial	#Catálogo
TaqMan 2x Universal PCR master mix no AmpErase UNG	10μL	Applied Biosystems	#4324018
H ₂ O libre de nucleasas	7,67μL	Qiagen	#1017979
TaqMan Assay Mix 20x de Sgpl1 o 18S	1μL	Applied Biosystems	#4331182
cADN obtenido	1,33μL	<i>Paso anterior*</i>	-

Tabla M.25. Amplificación de ADN mediante qPCR. La tabla muestra el nombre, las cantidades y las características comerciales de los reactivos empleados para realizar la amplificación del ADN mediante qPCR.

2. Centrifugar a 12.000g durante 10 segundos.
3. Cargar los 20μL en un pocillo de una placa translúcida de 96 pocillos para PCR (Applied Biosystems® by Life technologies™; #4346906). Cada muestra se carga por triplicado.
4. Sellar con una cobertura óptica adhesiva (Applied Biosystems® by Life technologies™; #4311971) y centrifugar durante 1min a 100xg.
5. Cargar la placa en un sistema de qPCR Applied Biosystems 7900HT.
6. Programar el *software* (SDS2.4; Applied Biosystem) para el siguiente programa:

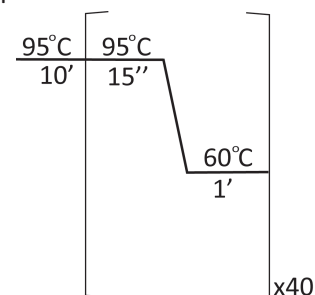


Figura M.14. Programa de qPCR para la amplificación de ADN. La figura muestra la temperatura, el tiempo y el número de ciclos empleados para llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de Sgpl1 y 18S mediante qPCR.

7. Exportar los datos obtenidos utilizando el *software* RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems).

Análisis de resultados

Realizamos la cuantificación relativa utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$. Este algoritmo calcula el número de ciclos (Ct)⁸ de diferencia entre el Ct de la muestra diana frente a una muestra control para calcular la diferencia de expresión. Para determinar el $\Delta\Delta Ct$, realizamos los siguientes pasos:

1. Calcular los Ct promedio de los triplicados del gen control endógeno (18S) y del gen diana (Sgpl1) para cada muestra.
2. Calcular el ΔCt ⁹ restando el valor de Ct del gen 18S al Ct del gen Sgpl1 por cada muestra:

$$\Delta Ct = Ct_{Sgpl1} - Ct_{18S}$$
3. Calcular el $\Delta\Delta Ct$ restando al ΔCt de cada muestra el Ct de la muestra control o de referencia:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{muestra\ control}$$

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SPL

Para determinar la actividad de SPL utilizamos el sustrato fluorogénico CB13, generado y cedido gentilmente por el equipo de Química Orgánica Avanzada de la Universitat de Barcelona, liderado por las Dras. Josefina Casas y Gemma Fabriàs. Este ensayo está basado en la analogía estructural entre el sustrato CB13 y la S1P, el sustrato original de la SPL. El corte del sustrato CB13 por la enzima SPL y su posterior tratamiento con metanol da lugar a la síntesis de umbeliferona, un compuesto con propiedades fluorescentes fácilmente cuantificables. Podemos establecer, por tanto, que al incorporar a la reacción sustrato CB13 en exceso (reactivo no limitante), la generación de umbeliferona es directamente proporcional a la actividad de la enzima SPL (Figura M.15).

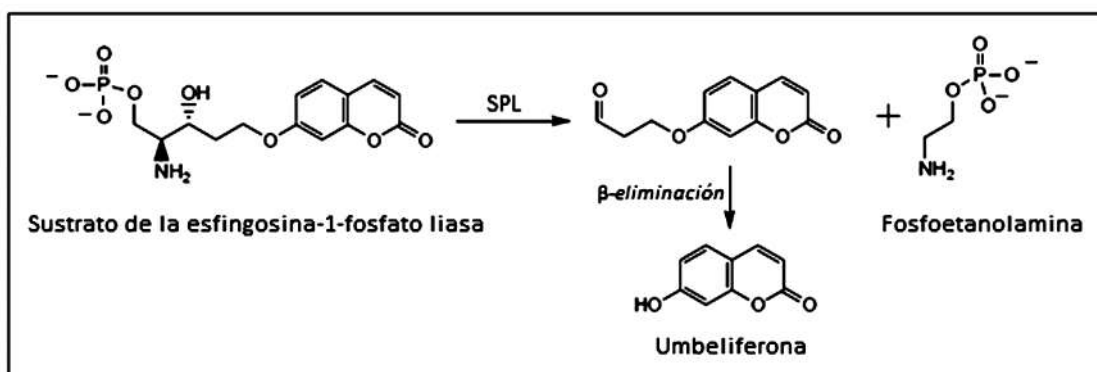


Figura M.15. Ensayo de actividad enzimática de la SPL. La imagen muestra la transformación química del sustrato CB13 tras la acción de la SPL empleado para el ensayo de actividad enzimática. Al ser tratado con metanol, el producto obtenido sufre una β -eliminación para dar lugar a la umbeliferona, el compuesto fluorescente medido en este ensayo. Modificado de Bedia et al. (2009).

⁸ Ct = ciclo umbral, intersección entre la curva de amplificación y una línea umbral definida automáticamente por el programa o manualmente.

⁹ ΔCt = Ct normalizado frente al control endógeno de carga.

Materiales utilizados

Para llevar a cabo el ensayo de actividad de la enzima SPL se emplean los siguientes reactivos:

- **Tampón fosfato 0,5M pH=7,4 (100mL):** preparar las siguientes disoluciones:
 - 1) **0,2M Fosfato potásico monobásico:** pesar 2,72g de fosfato potásico monobásico (Sigma; #P5655) y diluir en 40mL de agua destilada.
 - 2) **0,3M Fosfato potásico dibásico:** pesar 5,22g de fosfato potásico dibásico (Sigma; #P3786) y diluir en 40mL de agua destilada.Mezclar ambas disoluciones y enrasar a 100mL con agua destilada.
- **Tampón Glicina-KOH 0,2M pH=10,6:** glicina (Fisher Scientifics; #BP381-5). Diluir en agua destilada. Ajustar a pH=10,6 con KOH (Sigma; #P1767) 1M y 0,1M en agua destilada. Una vez ajustado el pH, enrasar con agua destilada.
- **Fluoruro sódico (NaF) 1M:** NaF (Sigma; #S7920). Diluir en agua destilada.
- **Ortovanadato sódico (Na_3VO_4) 1mM:** hacer una disolución intermedia de Na_3VO_4 (Sigma; #S6508) 100mM en agua destilada. A partir de ésta, hacer la disolución de concentración 1mM.
- **Piridoxal-5-fosfato (PLP) 200 μ M:** hacer una disolución intermedia de PLP (Sigma; #82870) 660 μ M y a partir de ésta, diluir para obtener la concentración deseada (200 μ M).
- **Sustrato (CB13) 0,83mM:** (P.M = 359,275g/mol). Diluir en tampón fosfato potásico 0,5M pH=7,4 hasta la concentración deseada.

Extracción de las muestras

El protocolo seguido para la extracción de muestras y de proteína total fue análogo al descrito en el apartado Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) e inmunomarcado (Western Blot); Extracción de muestras de origen *in vivo*.

Procedimiento

El protocolo para determinar la actividad enzimática de SPL fue el siguiente:

1. Mezclar los siguientes reactivos por cada pocillo en una placa P96 negra (Thermo scientific; #265301):
 - 75 μ L de lisado proteico a una concentración de 2,5mg/mL.
 - 15 μ L de sustrato CB13 0,83mM.
 - 5 μ L de PLP 200 μ M.
 - 2,5 μ L de NaF 1M.
 - 2,5 μ L de Na_3VO_4 1mM.
1. Tapar e incubar a 37°C y oscuridad durante 20h.
2. Añadir 50 μ L de MeOH (Sigma; #32213) y 100 μ L de tampón glicina-KOH 0,2M pH=10,6 a cada pocillo.
3. Tapar e incubar durante 2h a 37°C y oscuridad.
4. Medir la fluorescencia en una lectora de placas (Infinite M200; Tecan) empleando una longitud de onda de excitación de 365nm y de emisión de 460nm.

Análisis de resultados

Para la adquisición de datos empleamos el *software* Tecan i-Control 1.6.19.0 y para el tratamiento de los datos el *software* Microsoft® Office excel® 2013.

HISTOLOGÍA

EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

Disoluciones empleadas

Las disoluciones utilizadas en la preparación del tejido para histología son las siguientes:

- **NaOH 5M:** NaOH (Merck; #B0265262). Diluir en agua destilada.
- **PFA al 8% (p/v):** PFA (Sigma; #P6148). Diluir en agua destilada. Calentar a 62°C. La disolución quedará turbia. Añadir unas gotas de NaOH 5M hasta que la disolución quede transparente. Congelar a -20°C hasta su utilización. Usar al 4% diluyendo en tampón fosfato 0,2M y pH 7,4 (PB).
- **Tampón fosfato 0,2M y pH 7,4 (PB):** preparar las siguientes disoluciones:
 - 1) **Disolución de fosfato sódico dibásico 0,2M:** $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma; #S5136). Diluir en agua destilada.
 - 2) **Disolución de fosfato sódico monobásico 0,2M:** $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck; #A919646). Diluir en agua destilada.

Para obtener un pH = 7,4 mezclar 405mL de fosfato sódico dibásico 0,2M y 95mL de fosfato sódico monobásico 0,2M.

Procedimiento

A continuación se detalla el protocolo para la toracotomía (pasos 1-6), la perfusión cardíaca (pasos 7-11), la extracción de la muestra de médula espinal (pasos 12-15) y la preparación y corte del tejido en el criostato (pasos 15-18):

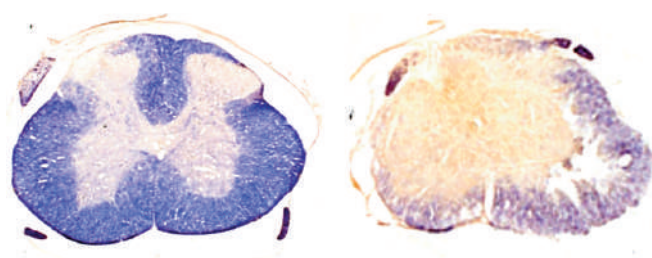
1. Anestesiarse al ratón con 20μL de pentobarbital (Dolethal; Vetoquinol S.A) y confirmar la ausencia de reflejos. La evaluación de reflejos se puede hacer pinzando las extremidades inferiores o el extremo distal de la cola.
2. Colocar al ratón en posición decúbito supino sobre una tabla inclinada (30° aprox.) y sujetar las extremidades con cinta adhesiva para inmovilizar al animal.
3. Sujetar parte de la piel del pecho con unas pinzas y retirarla con ayuda de unas tijeras, exponiendo la musculatura.
4. Pinzar el esternón, levantar ligeramente y hacer una incisión por debajo de la apófisis xifoides con ayuda de unas tijeras. El objetivo de este paso es crear una cavidad que permita sujetar directamente la apófisis xifoides con unas pinzas.
5. Abrir la caja torácica continuando el corte hasta, aproximadamente, la altura de las axilas.
6. Cortar el diafragma y levantar la caja torácica, fijándola con unas pinzas Halsted para exponer los distintos órganos.
7. Sujetar cuidadosamente el corazón con unas pinzas, levantando ligeramente la zona apical para facilitar el acceso al ventrículo izquierdo.
8. Introducir una aguja de 21G tipo mariposa en el ventrículo izquierdo, fijando la aguja al co-

- razón con unas pinzas Halsted. Esta aguja deberá estar previamente conectada a una sonda con una llave de doble vía para perfundir con suero salino y, posteriormente, con PFA al 4%.
9. Perfundir al animal con 100mL de suero salino 0,9% cloruro sódico (Serracol; #0459) con un suplemento del 0,1% de heparina sódica (Chiesi; 1000UI/ml) a una velocidad de 16mL/min utilizando una bomba peristáltica (Easy-load® Masterflex® L/S® Cole Palmer®; 7518-00). Al iniciar la administración, se realiza un corte en la aurícula derecha del corazón para permitir la evacuación de líquido. **Nota: evitar la entrada de burbujas al organismo durante todo el proceso.*
 10. Cambiar la vía de entrada girando la llave de doble vía hasta la posición correcta, manteniendo el sistema en las mismas condiciones y perfundir con 50mL de PFA al 4%.
 11. Retirar la aguja del corazón cuando el volumen de PFA al 4% esté llegando a su fin para evitar la entrada de aire al organismo.
 12. Proceder a la exposición de la médula espinal de la misma manera que en el apartado descrito anteriormente “Modelo murino de LME por contusión: procedimiento quirúrgico”. Exponer el segmento medular lesionado (correspondiente a la vértebra T9) y los correspondientes a las vértebras T8 y T10.
 13. Levantar ligeramente la médula y cortar las raíces ventrales con ayuda de unas microtijeras.
 14. Extraer la médula espinal de la cavidad vertebral y post-fijar el tejido en PFA al 4% durante 24 horas a 4°C para asegurar la fijación del tejido.
 15. Retirar el PFA al 4% y sumergir la muestra en sacarosa (Merck; #K44301587) al 30% en PBS con el fin de crioproteger el tejido. Mantener la muestra en sacarosa hasta que la densidad del tejido sea igual a la densidad de la disolución, es decir, hasta que la médula se hunda.
 16. Embeber la muestra en Tissue Tek® O.C.T™ (M-1 Embedding Matrix, Thermo Scientific; #1310) y congelar en un molde (Simport; #M475-3) a -20°C. Conservar a -80°C cerrada herméticamente hasta su procesado.
 17. Cortar las muestras de médula espinal en secciones de 20µm de grosor en un criostato (Microm HM 560).
 18. Adherir las secciones sobre portaobjetos ionizados (Menzel-Glaser Superfrost ultra Plus; #J4800AMNZ) y conservar a -80°C hasta su tinción.

TINCIÓN CON ERIOCROMO-CIANINA

La tinción con eriocromo –cianina tiñe de color azul la mielina de la sustancia blanca de la médula espinal, mientras que, debido a la menor cantidad de mielina en la sustancia gris, ésta permanece sin tinción (color blanquecino; Figura M.16). Esta tinción permite determinar la cantidad de sustancia blanca preservada tras una lesión medular.

Figura M.16. Tinción con eriocromo-cianina. La imagen de la izquierda muestra el aspecto característico de una tinción con eriocromo-cianina en médula espinal en el segmento medular correspondiente a T9 en ratón. La imagen de la derecha muestra la tinción en el epicentro de una lesión medular en ratón en el mismo segmento medular.



Disoluciones y reactivos utilizados

- **Acetona** (Sigma, #Catálogo 179124)
- **Alumbre de hierro al 5% y al 10% (p/v)**: sulfato ferroso amónico (Sigma; #F3629). Diluir en agua destilada. Guardar a R/T.
- **Solución de eriocromo-cianina**. Combinar los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad	Casa comercial	#Catálogo
Eriocromo cianina RS	0,2g	Sigma	E2505
Ácido sulfúrico	500μL	Merck	K38272031
Agua destilada	96mL	-	-
Solución de alumbre de hierro al 10%	4mL	<i>Paso anterior*</i>	-
Filtrar la solución y proteger de la luz. Conservar a R/T.			

Tabla M.26. Solución de eriocromo-cianina. La tabla muestra el nombre, la cantidad y las características comerciales de los reactivos requeridos para preparar la solución de eriocromo-cianina.

- **Solución bórax-ferricianina**. Combinar los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad	Casa comercial	#Catálogo
Borax	1g	Sigma	B3545
Ferricianida potásica	1,25g	Sigma	P8131
Agua destilada	100mL	-	-
Conservar a R/T.			

Tabla M.27. Solución de bórax-ferricianina. La tabla muestra el nombre, la cantidad y las características comerciales de los reactivos requeridos para preparar la solución de bórax-ferricianina.

Procedimiento

A continuación se describe el protocolo seguido para las tinciones con eriocromo-cianina:

1. Secar las preparaciones durante una hora a 37°C.
2. Incubar en acetona durante 5 min a R/T.
3. Incubar en solución de eriocromo-cianina durante 30 min a R/T.
4. Lavar con agua del grifo (3x10min).
5. Tratar con solución de alumbre de hierro al 5% durante 10min a R/T.
6. Lavar con agua del grifo (3x10min).
7. Incubar con solución de bórax durante 5 min a R/T.
8. Lavar utilizando agua del grifo (3x10min).
9. Deshidratar la muestra:
 - a. Incubar con etanol al 70% (2x2min).
 - b. Incubar con etanol al 96% (2x4min).
 - c. Incubar con etanol al 100% (2x8min).
 - d. Incubar con HistoChoice® Clearing Agent (Sigma, #H2779) durante 30 min.
10. Montar en DPX (Merck; #HX754110).

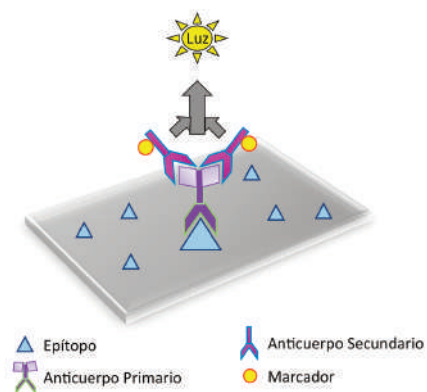
Análisis de resultados

Seleccionamos las preparaciones destinados al análisis de las muestras teñidas utilizando un sistema de tipo aleatorio. Para determinar la preservación de la sustancia blanca calculamos, en cada corte medular, el área total de la sección y el área de tinción de eriocromo-cianina (sustancia blanca preservada) utilizando una malla de conteo insesgada implementada en el *software* Visiopharm Integrator System (VIS) 3.6.5.0. Posteriormente, utilizamos la relación de la sustancia blanca respecto al área total (% de sustancia blanca) para estimar la preservación tisular.

INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) se basan en el empleo de anticuerpos que reconocen como epítipo una sustancia de interés, permitiendo determinar su localización celular o tisular. Los anticuerpos utilizados en la presente tesis, requieren la unión a un anticuerpo secundario para poder visualizar la unión del anticuerpo primario al epítipo de la sustancia reconocida (Figura M.17).

Figura M.17. Base de la inmunohistoquímica. La figura ilustra el fundamento teórico para la identificación de dianas mediante la técnica de inmunohistoquímica.



Anticuerpos y disoluciones utilizados

Los anticuerpos utilizados en la presente tesis fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios						
Anticuerpo	Origen	Tipo	Casa comercial	#Catálogo	Dilución	RRID
S1P	Ratón	Monoclonal	Alfresa Pharma Corporation	ALF-274042034	1:100	AB_1962486
NeuN	Conejo	Policlonal	Millipore	ABN78	1:500	AB_10807945
GFAP	Pollo	Policlonal	Abcam	Ab4674	1:500	AB_304558
APC	Ratón	Monoclonal	Calbiochem	OP80	1:200	AB_2057371
Anticuerpos secundarios						
Secundario Alexa 488 de cabra contra ratón			Molecular Probes	A11001	1:500	AB_2534069
Secundario Alexa 594 de cabra contra ratón			Molecular Probes	A11005	1:500	AB_141372
Secundario Alexa 633 de cabra contra ratón			Molecular Probes	A21050	1:500	AB_2535718

Tabla M.28. Listado de anticuerpos empleados para IHQ. La tabla muestra los anticuerpos primarios y secundarios empleados para el análisis mediante IHQ, la especie en la que han sido generados (origen), el tipo de anticuerpo, la casa comercial, el número de catálogo y la dilución empleada en los estudios de esta tesis. RRID= Código del registro de anticuerpos.

Además, también utilizamos marcajes fluorescentes no basados en anticuerpos para complementar las tinciones:

- **Dihidrocloreto de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma, #D9542):** un agente fluorescente, permeable en la membrana, que se une de forma reversible al surco menor del ADN de doble cadena, formando un complejo estable cuya fluorescencia es 20 veces superior a la del DAPI no unido a ADN. El DAPI unido a ADN se excita y emite a una longitud de onda de 364nm y 454nm, respectivamente. Utilizamos el DAPI diluido en el medio de montaje a una concentración 0,3µL/mL para teñir los núcleos de las células.
- **Isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia* (IB4; Sigma Aldrich, #L2140; dilución empleada 1:100):** la tinción con IB4 permite la identificación de células microgliales en el SNC adulto. Aunque esta lectina también presenta afinidad por las células endoteliales ésta es mucho menor que su afinidad por la microglía (Streit and Kreutzberg, 1987). La isolectina empleada va conjugada a biotina y, por tanto, se revela con un fluoróforo conjugado a estreptavidina (Alexa Fluor® 488 conjugado; ThermoFisher Scientific, #S11223; RRID= AB_2336881).

También empleamos las siguientes soluciones:

- **Solución de bloqueo:** (1% (p/v) BSA (Sigma; #A7906) + 0,2% (v/v) tritón (Sigma; #T8787) en PBS.
- **Solución de anticuerpos:** (0,1% (p/v) BSA + 0,2% (v/v) tritón + anticuerpos (según la concentración descrita en la tabla anterior (Tabla M.28) en PBS.
- **Solución de lavado:** 0,3% (v/v) de tritón X-100 en PBS.

Procedimientos

Inmunohistoquímica general

El protocolo de IHQ utilizado se describe detalladamente a continuación:

1. Secar las preparaciones durante 60 min a 37°C.
2. Perfilear el contorno del portaobjetos con un rotulador hidrófobo (ImmEdge™ Pen; #H4000).
3. Hidratar las muestras en solución de lavado durante 15min a R/T y con balanceo.
4. Incubar con solución de bloqueo en una cámara húmeda durante 2 horas a R/T.
5. Incubar con la solución de anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. **Nota: el control de anticuerpos secundarios se realiza sin incubar con el anticuerpo primario.*
6. Lavar con solución de lavado durante 10 min y agitación suave. Repetir 3 veces.
7. Incubar las preparaciones con la solución de anticuerpos secundarios durante 90 min a R/T. A partir de este paso, realizar todo el procedimiento manteniendo la muestra en oscuridad para evitar perder fluorescencia en la tinción.
8. Lavar con solución de lavado durante 10 min y agitación suave. Repetir 3 veces.
9. Montar con 50µL (aprox.) de medio de montaje (Dako; #S3023) con un 3% (v/v) de DAPI 1:100 en PBS.

10. Tapar con un cubreobjetos cuidando de que no se formen burbujas. Dejar secar a R/T y oscuridad.
11. Aplicar esmalte de uñas transparente en los filos para conservar la humedad y evitar la entrada de burbujas de aire que puedan estropear la tinción.

Inmunohistoquímica utilizando el Kit M.O.M

El único anticuerpo comercial disponible para la detección de S1P mediante inmunohistoquímica está generado en ratones, la misma especie sobre la que determinamos la presencia de S1P. El problema de utilizar un anticuerpo generado en ratón en una IHQ de tejido de ratón es que el anticuerpo secundario no distingue entre el anticuerpo primario y las inmunoglobulinas endógenas del tejido. Para evitar esto, es necesario bloquear las inmunoglobulinas endógenas del tejido minimizando las uniones inespecíficas del anticuerpo secundario y manteniendo la correcta visualización de su unión al anticuerpo primario.

Para este procedimiento utilizamos el kit de IHQ *mouse on mouse* M.O.M™ (Vector; #BML-2202) según el protocolo del fabricante con las siguientes modificaciones:

1. Secar las preparaciones durante 60 min a 37°C.
2. Perfilar el contorno del portaobjetos con un rotulador hidrófobo (ImmEdge™ Pen; #H4000).
3. Incubar los portaobjetos en una cámara húmeda durante 1 hora a R/T con la solución *Blocking Reagent* del kit Vector® M.O.M™.
4. Lavar con PBS (2 x 5min) con balanceo.
5. Pre-incubar los portaobjetos con la solución *Diluent* del kit Vector® M.O.M™ en la cámara húmeda durante 5 min.
6. Incubar con el anticuerpo primario (en nuestro caso contra S1P) diluido en la solución *Diluent* kit Vector® M.O.M™ en la cámara húmeda durante 30 min a R/T.
7. Lavar con PBS (2 x 5min) con balanceo
8. Incubar con el anticuerpo secundario fluorescente diluido en la solución *Diluent* kit Vector® M.O.M™ en la cámara húmeda durante 30 min a R/T.
9. Lavar con PBS (3 x 5min) con balanceo
10. Lavar con TBS durante 10 min a R/T y con agitación.
11. Montar con 50µL (aprox.) de medio de montaje (Dako; #S3023) combinado con un 3% (v/v) de DAPI 1:100 en PBS.
12. Tapar con un cubreobjetos cuidando de que no se formen burbujas. Dejar secar. Aplicar esmalte de uñas transparente en los filos para conservar la humedad y evitar la entrada de burbujas de aire que puedan estropear la tinción.

Para determinar la presencia de S1P y su distribución celular combinamos el anticuerpo contra S1P con anticuerpos específicos para el marcaje de neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y microglía. En estos casos, comenzamos realizando la IHQ según el protocolo descrito en el apartado anterior; concretamente los pasos 1-8 y, seguidamente, llevamos a cabo la tinción para S1P utilizando el kit Vector® M.O.M™ según el protocolo descrito en este apartado a partir del paso 3.

Análisis de resultados: cuantificación de células neurales

Una vez teñidas, las secciones fueron fotografiadas empleando el microscopio confocal TCS SP5 de escaneo rápido (LEICA) con un objetivo HCX PL APO CS 20.0x0.70 DRY UV y un Zoom Digital de 1.7. Para el tratamiento y análisis de las imágenes obtenidas utilizamos el software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

Para estimar el número de células neurales analizamos las imágenes de manera automática haciendo uso de macros específicas para cada población. Las ventajas de utilizar estas macros son:

1. Objetivación de los criterios para reconocer poblaciones celulares, minimizando así la subjetividad del usuario a la hora de analizar las imágenes.
2. Automatización del proceso, optimizando el tiempo empleado en el análisis.

Debido al tamaño de las imágenes analizadas para cubrir totalmente la sección medular, en muchos casos aparecen zonas oscuras en un único plano confocal al no estar la muestra totalmente paralela respecto al plano del microscopio. Para conseguir una completa representación de la sección medular, realizamos los análisis utilizando la proyección máxima de 3 planos confocales consecutivos, centrados en el plano con mayor representación de la sección medular. Como consecuencia, los resultados obtenidos son estimativos (no cuantitativos) del número de células presentes en las distintas secciones analizadas. Las condiciones de captura de la imagen entre fotos fueron idénticas para poder aplicar en todos los casos la misma macro y que los resultados obtenidos fueran comparables entre sí.

Conteo de neuronas

La siguiente macro fue diseñada para estimar el número de núcleos neuronales en imágenes de médula espinal teñida con anticuerpo policlonal de conejo contra NeuN para el marcaje de neuronas y DAPI para la tinción del núcleo celular (diluciones descritas en la Tabla M.28). Las fotografías analizadas están formadas por mosaicos de imágenes 1024x1024 píxeles para representar la totalidad de la sección medular espinal. Los parámetros seleccionados para la captura de imágenes fueron los siguientes:

Parámetros	Canal 1	Canal 2
Tinción	DAPI	NeuN
Excitación	Láser UV 405	Láser Argón 488
AOTF (potencia del láser)	19%	29%
Emisión (PMT)	$\lambda = 415 - 485 \text{ nm}$	$\lambda = 501-559 \text{ nm}$
Pinhole	Airy1	
Escala	1pixel=445,6nm	
Distancia Z	1,5 μm	
Resolución	8bits	
Nº de medias	8	

Tabla M.29. Características de adquisición de imágenes de neuronas. La tabla muestra los parámetros técnicos utilizados en la adquisición de imágenes para los contajes de neuronas.

Para iniciar este análisis es necesario abrir la imagen con el *software* ImageJ, escoger la opción *Specify range for each series*, seleccionar tres planos consecutivos y centrados en el de mayor intensidad de NeuN y ejecutar la macro. De forma general, el procedimiento seguido por la macro es el siguiente:

1. Hace la proyección máxima de los planos elegidos.
2. Trata la imagen (filtros de mediana, eliminar fondo...) para resaltar el marcaje obtenido, eliminando posible ruido.
3. Se detiene momentáneamente para que el usuario seleccione manualmente el área de sustancia gris y, seguidamente, crea la máscara que define el área.
4. Aplica un umbral de intensidad (*threshold*) para binarizar la imagen y generar una imagen nueva que mantenga los elementos identificados como neuronas dentro del área de sustancia gris, de modo que elimina los posibles artefactos de la sustancia blanca.
5. Analiza la imagen con la tinción de DAPI excluyendo las meninges.
6. Binariza y analiza el número de partículas excluyendo aquellas con un tamaño superior o inferior a un núcleo.
7. Determina las neuronas con núcleo presentes en la imagen calculando aquellas partículas que presenten doble marcaje (DAPI+NeuN).

La siguiente tabla muestra la secuencia de comandos utilizada en el procesado de la imagen, con una breve explicación de su aplicación:

Comandos	Acción ejecutada
macro "neuronas [6]" {	Identifica la macro, crea un atajo de teclado pulsando la tecla "6" e indica el inicio de la macro.
print("hi,");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
print("initiating");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
saveAs("Tiff", "raw.tif");	Guarda la imagen activa con los parámetros ("formato", "nombre.extensión") definidos.
run("Split Channels");	Separa los canales de la imagen activa.
run("Set... ", "zoom=5");	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
selectWindow("C1-raw.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Set... ", "zoom=5");	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
run("Z Project...", "start=1 stop=5 projection=[Max Intensity]");	Realiza la proyección máxima de los planos.
selectWindow("C1-raw.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
close();	Cierra la ventana activa.
selectWindow("MAX_C1-raw.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Median...", "radius=2");	Aplica un filtro tipo mediana de radio=2.
saveAs("Tiff", "NUnn.tif");	Guarda la imagen activa con los parámetros ("formato", "nombre.extensión") definidos.
run("Set... ", "zoom=5");	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
run("Duplicate...", "title=NUt.tif");	Duplica la ventana activa y la nombra según el "title=nombre.extensión" definidos.
run("Set... ", "zoom=5");	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
print ("projecting focal planes of NeuN");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
selectWindow("C2-raw.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Z Project...", "start=1 stop=5 projection=[Max Intensity]");	Realiza la proyección máxima de los planos.
selectWindow("C2-raw.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
close();	Cierra la ventana activa.
print("done");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
print("preprocessing NeuN image");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
selectWindow("MAX_C2-raw.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Original Scale");	Redimensiona la imagen a su tamaño original.

<code>run("Median...", "radius=2");</code>	Aplica un filtro tipo mediana de radio=2.
<code>run("Subtract Background...", "rolling=30");</code>	Resta el fondo de la imagen activa aplicando un suavizado de valor 30.
<code>setTool("polygon");</code>	Selecciona la herramienta "polígono".
<code>print("NeuN image preprocessed");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>waitForUser ("User input", "Select the grey substance and press OK");</code>	Detiene la macro hasta que el usuario seleccione la sustancia gris y pulse la casilla "OK".
<code>run("Create Mask");</code>	Convierte la imagen activa en una máscara en blanco y negro.
<code>saveAs("Tiff", "Sustgris.tif");</code>	Guarda la imagen activa con los parámetros ("formato", "nombre.extensión") definidos.
<code>run("Set... ", "zoom=5");</code>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<code>selectWindow("MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Duplicate...", "title=medula.tif");</code>	Duplica la ventana activa y la nombra según el "title=nombre.extensión" definidos.
<code>run("Set... ", "zoom=5");</code>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<code>selectWindow("MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Auto Threshold...", "method=[Try all] white");</code>	Muestra diferentes mascarar que se ajustan a la imagen activa.
<code>Dialog.create("User input");</code>	Crea un cuadro de dialogo que muestra el mensaje entre comillas.
<code>Dialog.addMessage("choose the most appropriate threshold\n and apply it at image/adjust/autothreshold\n close Montage window\n once thresholded press 7")</code>	Crea un cuadro de dialogo que muestra el mensaje entre comillas. El usuario elige el método de <i>threshold</i> más apropiado.
<code>Dialog.show();</code>	Muestra el cuadro de dialogo creado previamente.
<code>}</code>	Indicador de fin de la macro.
<code>macro "nucleos totales [7]" {</code>	Identifica la macro, crea un atajo de teclado pulsando la tecla "7" e indica el inicio de la macro.
<code>selectWindow("MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Analyze Particles...", "size=20-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks");</code>	Analiza las partículas contenidas en la imagen que cumplan los criterios de tamaño y circularidad descritos. Además, crea una mascara con los resultados.
<code>selectWindow("MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close()</code>	Cierra la ventana activa.
<code>imageCalculator("AND create", "Mask of MAX_C2-raw.tif", "Sustgris.tif");</code>	Crea una imagen nueva con los elementos de las dos fotos especificadas entre comillas.
<code>selectWindow("Sustgris.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.

close();	Cierra la ventana activa.
selectWindow("Mask of MAX_C2-raw.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
close();	Cierra la ventana activa.
selectWindow("Result of Mask of MAX_C2-raw.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Options...", "iterations=2 count=1 edm=Overwrite do=Erode");	Disminuye el tamaño de los objetos según el algoritmo "Erode" aplicado 2 veces.
saveAs("Tiff", "NEU.tif");	Guarda la imagen activa con los parámetros ("formato", "nombre.extensión") definidos.
run("Set...", "zoom=5");	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
print("preprocessing nuclei images");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
selectWindow("NUt.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Add...", "value=100");	Suma el valor entrecomillado de intensidad a la imagen activa.
run("Subtract Background...", "rolling=40");	Resta el fondo de la imagen activa aplicando un suavizado de valor 40.
run("Auto Threshold", "method=Li white");	Binariza la imagen según el algoritmo "Li White".
run("Original Scale");	Redimensiona la imagen a su tamaño original.
setTool("polygon");	Selecciona la herramienta "polígono".
print ("done");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
waitForUser ("User input", "Select the spinal cord and press OK to continue")	Detiene la macro hasta que el usuario seleccione el perímetro de la médula y pulse la casilla "OK".
selectWindow("NUt.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks summarize");	Analiza las partículas contenidas en la imagen que cumplan los criterios de tamaño y circularidad descritos. Además, crea una máscara con los resultados.
selectWindow("NUt.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
close();	Cierra la ventana activa.
print("thresholding nuclei images");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
selectWindow("NUnn.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Subtract...", "value=150");	Resta el valor entrecomillado de intensidad a la imagen activa.
run("Auto Threshold...", "method=Li white");	Binariza la imagen según el modelo entrecomillado.
run("Watershed");	Separa las partículas dobles de la imagen binarizada activa según el algoritmo "Watershed".
print("counting nuclei");	Crea una ventana "log" que muestra el

	mensaje entre comillas.
run("Analyze Particles...", "size=80-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks");	Analiza las partículas contenidas en la imagen que cumplan los criterios de tamaño y circularidad descritos. Además, crea una máscara con los resultados.
selectWindow("NUnn.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
close();	Cierra la ventana activa.
print("done");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
selectWindow("Mask of NUnn.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Options...", "iterations=5 count=1 edm=Overwrite do=Dilate");	Aumenta el tamaño de los objetos según el algoritmo "Dilate" aplicado 5 veces.
imageCalculator("Subtract create", "Mask of NUt.tif", "Mask of NUnn.tif");	Crea una imagen nueva restando a la primera imagen los elementos de la segunda imagen especificada.
selectWindow("Mask of NUt.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
close();	Cierra la ventana activa.
selectWindow("Mask of NUnn.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
close();	Cierra la ventana activa.
selectWindow("Result of Mask of NUt.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Options...", "iterations=1 count=1 edm=Overwrite do=Dilate");	Aumenta el tamaño de los objetos según el algoritmo "Dilate".
run("Options...", "iterations=1 count=1 edm=Overwrite do=Close");	Cierra los objetos dándoles un aspecto más circular, según el algoritmo "Close".
run("Watershed");	Separa las partículas dobles de la imagen binarizada activa según el algoritmo "Watershed".
print("identifying neuron nuclei");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
imageCalculator("AND", "NEU.tif", "Result of Mask of NUt.tif");	Crea una imagen nueva con los elementos de las dos fotos especificadas entre comillas.
run("Options...", "iterations=1 count=1 edm=Overwrite do=Dilate");	Aumenta el tamaño de los objetos según el algoritmo "Dilate".
imageCalculator("AND", "NEU.tif", "Result of Mask of NUt.tif");	Crea una imagen nueva con los elementos de las dos fotos especificadas entre comillas.
run("Dilate");	Aumenta el tamaño de los objetos según el algoritmo "Dilate".
imageCalculator("AND", "NEU.tif", "Result of Mask of NUt.tif");	Crea una imagen nueva con los elementos de las dos fotos especificadas entre comillas.
run("Dilate");	Aumenta el tamaño de los objetos según el algoritmo "Dilate".
imageCalculator("AND", "NEU.tif", "Result of Mask of NUt.tif");	Crea una imagen nueva con los elementos de las dos fotos especificadas entre

	comillas.
run("Dilate");	Aumenta el tamaño de los objetos según el algoritmo "Dilate".
imageCalculator("AND", "NEU.tif", "Result of Mask of NUt.tif");	Crea una imagen nueva con los elementos de las dos fotos especificadas entre comillas.
print ("done");	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
selectWindow("Result of Mask of NUt.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
close();	Cierra la ventana activa.
selectWindow("medula.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Original Scale");	Redimensiona la imagen a su tamaño original.
selectWindow("NEU.tif");	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
run("Original Scale");	Redimensiona la imagen a su tamaño original.
Dialog.create("Process finished")	Crea un cuadro de dialogo que muestra el mensaje entre comillas.
Dialog.addMessage("Name and save the file,\n select the region of interest (use the original image to help you)\n and analyze particles (Analyze/analyze particles)")	Crea un cuadro de dialogo que muestra el mensaje entre comillas.
Dialog.show()	Muestra el cuadro de dialogo.
run("Tiff...");	Guardar imagen como "extensión..."
}	Indicador de fin de la macro.

Tabla M.30. Macro para el conteo de neuronas. La tabla muestra el código empleado para el conteo de neuronas mediante análisis automatizado empleando el software ImageJ.

Conteo de oligodendrocitos

La siguiente macro fue diseñada para estimar el número de oligodendrocitos con núcleo en imágenes de médula espinal teñida con anticuerpo monoclonal de ratón contra APC para el marcaje de oligodendrocitos y DAPI para la tinción del núcleo celular (diluciones descritas en la Tabla M.28). Las fotografías analizadas están formadas por mosaicos de imágenes 1024x1024 pixeles para representar la totalidad de la sección medular espinal. Los parámetros seleccionados para la captura de imágenes fueron los siguientes:

Parámetros	Canal 1	Canal 2	Canal 3
Tinción	DAPI	APC	NeuN
Excitación	Láser UV 405	Láser Argón 488	Láser Diodo 561
AOTF (potencia del láser)	20%	30%	20%
Emisión (PMT)	$\lambda = 415 - 478 \text{ nm}$	$\lambda = 501-559 \text{ nm}$	$\lambda = 695-765 \text{ nm}$
Pinhole	Airy1		
Escala	1pixel=445,6nm		
Distancia Z	1,5 μm		
Resolución	8bits		
Nº de medias	8		

Tabla M.31. Características de adquisición de imágenes de oligodendrocitos. La tabla muestra los parámetros técnicos utilizados en la adquisición de imágenes para los conteos de oligodendrocitos.

Para iniciar este análisis es necesario abrir la imagen con el *software* ImageJ, escoger la opción *Specify range for each series*, seleccionar tres planos consecutivos y centrados en el de mayor intensidad de APC y ejecutar la macro. De forma general, el procedimiento seguido por la macro es el siguiente:

1. Realiza la proyección máxima de los planos elegidos en el canal DAPI y se detiene momentáneamente para que el usuario seleccione la región sin meninges.
2. Trata la imagen (filtros de mediana, eliminar fondo...) para resaltar el marcaje obtenido, eliminando posible ruido.
3. Binariza la imagen, limitando el tamaño de las partículas para obtener la plantilla de núcleos de la región de interés.
4. Realiza la proyección máxima de los planos elegidos en el canal de APC y trata la imagen para resaltar el marcaje, eliminando el posible ruido.
5. Duplica la imagen tratada del marcaje de APC aplicando un filtro de alto suavizado para restarlo al marcaje original tratado y eliminar aún más ruido de fondo.
6. Selecciona el canal con el marcaje para neuronas, realiza la proyección máxima de los planos seleccionados y binariza la imagen empleando un umbral de intensidad (*threshold*) de 39. Elegimos este valor debido a que elimina el fondo inespecífico sin comprometer el marcaje de interés.
7. Resta la máscara resultante del paso anterior al marcaje de APC para eliminar marcaje inespecífico incluyendo la autofluorescencia del tejido.
8. Binariza la imagen obtenida del marcaje para oligodendrocitos y realiza un análisis de partículas aplicando una restricción de tamaño.
9. Crea la imagen intersección de las partículas identificadas como núcleo y aquellas que presentan marcaje para APC, limitando así la consideración de oligodendrocitos a aquellas células con núcleo.
10. Registra todas las partículas reconocidas como núcleos y analiza únicamente aquellas con marcaje de APC, obteniendo el número total de núcleos celulares y el número de oligodendrocitos.

La siguiente tabla muestra la secuencia de comandos utilizada en el procesado de la imagen, con una breve explicación de su aplicación:

<i>macro "oligos [6]" {</i>	Identifica la macro, crea un atajo de teclado pulsando la tecla "6" e indica el inicio de la macro.
<i>print("Hi");</i>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<i>print("Initiating...");</i>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<i>saveAs("Tiff", "raw.tif");</i>	Guarda la imagen activa con los parámetros ("formato", "nombre.extensión") definidos.
<i>run("Split Channels");</i>	Separa los canales de la imagen activa.
<i>run("Set... ", "zoom=5");</i>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<i>selectWindow("C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>run("Set... ", "zoom=5");</i>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<i>run("Z Project...", "start=1 stop=10 projection=[Max Intensity]");</i>	Realiza la proyección máxima de los planos.
<i>run("Duplicate...", "title=[duplinucleos]");</i>	Duplica la ventana activa y la nombra según el "title=nombre.extensión" definidos.
<i>selectWindow("duplinucleos");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>run("Set... ", "zoom=5");</i>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<i>selectWindow("C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>close();</i>	Cierra la ventana activa.
<i>selectWindow("MAX_C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>setTool("polygon");</i>	Selecciona la herramienta "polígono".
<i>print("Nucleos image preprocessed");</i>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<i>waitForUser ("User input", "Selecciona área sin meninges y DESPUÉS pulsa OK");</i>	Detiene la macro hasta que el usuario seleccione la sección sin meninges y pulse la casilla "OK".
<i>run("Median...", "radius=2");</i>	Aplica un filtro tipo mediana de radio=2.
<i>run("Subtract Background...", "rolling=30");</i>	Resta el fondo de la imagen activa aplicando un suavizado de valor 30.
<i>run("Multiply...", "value=2");</i>	Multiplica la intensidad a la imagen activa por el valor entrecomillado.
<i>run("Subtract Background...", "rolling=30");</i>	Resta el fondo de la imagen activa aplicando un suavizado de valor 30.
<i>run("Add to Manager");</i>	Contabiliza y localiza las partículas de la imagen activa.
<i>run("Make Binary");</i>	Binariza la imagen activa.
<i>run("Watershed");</i>	Separa las partículas dobles de la imagen binarizada activa según el algoritmo "Watershed".
<i>roiManager("Select", 0);</i>	Selecciona el primer registro añadido al ROI manager.
<i>run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks clear add");</i>	Analiza las partículas contenidas en la imagen que cumplan los criterios de tamaño y circularidad descritos. Además,

	crea una mascara con los resultados.
<code>print("Mask of MAX_C1-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>selectWindow("C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Set...", "zoom=5");</code>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<code>run("Z Project...", "start=1 stop=10 projection=[Max Intensity]");</code>	Realiza la proyección máxima de los planos.
<code>run("Duplicate...", "title=[duplimarcaje]");</code>	Duplica la ventana activa y la nombra según el "tittle=nombre.extensión" definidos.
<code>selectWindow("duplimarcaje");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Set...", "zoom=5");</code>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<code>selectWindow("C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Median...", "radius=2");</code>	Aplica un filtro tipo mediana de radio=2.
<code>run("Subtract...", "value=30");</code>	Resta el valor entrecomillado de intensidad a la imagen activa.
<code>run("Multiply...", "value=2");</code>	Multiplica la intensidad a la imagen activa por el valor entrecomillado.
<code>run("Duplicate...", "title=[filtro]");</code>	Duplica la ventana activa y la nombra según el "tittle=nombre.extensión" definidos.
<code>selectWindow("filtro");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Median...", "radius=20");</code>	Aplica un filtro tipo mediana de radio=20.
<code>imageCalculator("Subtract create", "MAX_C2-raw.tif", "filtro");</code>	Crea una imagen nueva restando los elementos de la segunda foto a la primera foto; ambas especificadas entre comillas.
<code>print("Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>selectWindow("MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>rename("MAX_C2-raw.tif"); // C2 es el marcaje de APC</code>	Renombra la imagen activa con el nombre especificado entre comillas.
<code>selectWindow("C3-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Set...", "zoom=5");</code>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<code>run("Z Project...", "start=1 stop=10 projection=[Max Intensity]");</code>	Realiza la proyección máxima de los planos.
<code>selectWindow("C3-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("MAX_C3-raw.tif"); // C3 es NeuN</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.

<code>setThreshold(39, 255);</code>	Acota el umbral mínimo de intensidad al especificado entre comillas.
<code>run("Convert to Mask");</code>	Transforma la imagen en una máscara.
<code>imageCalculator("Subtract create", "MAX_C2-raw.tif", "MAX_C3-raw.tif");</code>	Crea una imagen nueva restando los elementos de la segunda foto a la primera foto; ambas especificadas entre comillas.
<code>print("Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>selectWindow("MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("MAX_C3-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Duplicate...", "title=[marcWOautof]");</code>	Duplica la ventana activa y la nombra según el "tittle=nombre.extensión" definidos.
<code>selectWindow("Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Make Binary");</code>	Binariza la imagen activa.
<code>run("Analyze Particles...", "size=10-infinite circularity=0.00-1.00 show=Masks clear add");</code>	Analiza las partículas contenidas en la imagen que cumplan los criterios de tamaño y circularidad descritos. Además, crea una mascara con los resultados.
<code>print("Mask of Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>imageCalculator("AND create", "Mask of MAX_C1-raw.tif", "Mask of Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Crea una imagen nueva con la intersección de los elementos comunes de las fotos especificadas entre comillas.
<code>print("Result of Mask of MAX_C1-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>run("Merge Channels...", "c3=[duplinucleos] c5=duplimarcaje create keep");</code>	Crea una imagen combinada de varias imágenes en los canales especificados por el usuario.
<code>selectWindow("Composite");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>rename("NORMAL.tif")</code>	Renombra la imagen activa con el nombre especificado entre comillas.
<code>run("Stack to RGB", "");</code>	Convierte la imagen activa en formato RGB.
<code>run("Merge Channels...", "c3=[duplinucleos] c5=[marcWOautof] create keep");</code>	Crea una imagen combinada de varias imágenes en los canales especificados por el usuario.
<code>selectWindow("Composite");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Stack to RGB", "");</code>	Convierte la imagen activa en formato RGB.
<code>selectWindow("duplimarcaje");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("duplinucleos");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.

<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("MAX_C1-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing add clear add");</code>	Analiza las partículas contenidas en la imagen que cumplan los criterios de tamaño y circularidad descritos.
<code>print("Mask of MAX_C1-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>roiManager("Show All with labels");</code>	Muestra la localización de las partículas registradas sobre la imagen activa.
<code>roiManager("Show All");</code>	Muestra las partículas registradas en el <i>ROI Manager</i> sobre la imagen activa.
<code>selectWindow("Result of Mask of MAX_C1-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>roiManager("Select all");</code>	Selecciona todas las regiones de interés registradas en el <i>ROI Manager</i> .
<code>roiManager("Measure");</code>	Mide distintos parámetros en todas las regiones de interés registradas en el <i>ROI Manager</i> .
<code>selectWindow("Composite (RGB)");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>roiManager("Show All");</code>	Muestra las partículas registradas en el <i>ROI Manager</i> sobre la imagen activa.
<code>selectWindow("Result of Mask of MAX_C1-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("MAX_C1-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("Mask of Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("filtro");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("Mask of MAX_C1-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>}</code>	Indicador de fin de la macro.

Tabla M.32. Macro para el conteo de oligodendrocitos. La tabla muestra el código empleado para el conteo de oligodendrocitos mediante análisis automatizado empleando el software ImageJ.

Conteo de microglía

La siguiente macro fue diseñada para estimar el número de células microgliales con núcleo en imágenes de médula espinal teñida con anticuerpo policlonal de conejo contra IB4 para el marcaje de microglía y DAPI para la tinción del núcleo celular, según las diluciones descritas en la Tabla M.28. Las fotografías analizadas están formadas por mosaicos de imágenes 1024x1024 píxeles para representar la totalidad de la sección medular espinal. Los parámetros seleccionados para la captura de imágenes fueron los siguientes:

Parámetros	Canal 1	Canal 2
Tinción	DAPI	IB4
Excitación	Láser UV 405	Láser Argón 488
AOTF (potencia del láser)	20%	30%
Emisión (PMT)	$\lambda = 415 - 478 \text{ nm}$	$\lambda = 501-559 \text{ nm}$
Pinhole	Airy1	
Escala	1pixel=445,6nm	
Distancia Z	1,5 μm	
Resolución	8bits	
Nº de medias	8	

Tabla M.33. Características de adquisición de imágenes de microglía. La tabla muestra los parámetros técnicos utilizados en la adquisición de imágenes para los conteos de microglía.

Para iniciar este análisis es necesario abrir la imagen con el *software* ImageJ, escoger la opción *Specify range for each series*, seleccionar tres planos consecutivos y centrados en el de mayor intensidad de IB4 y ejecutar la macro. De forma general, el procedimiento seguido por la macro es el siguiente:

1. Realiza la proyección máxima de los planos elegidos en el canal DAPI y se detiene momentáneamente para que el usuario seleccione la región sin meninges.
2. Trata la imagen (filtros de mediana, eliminar fondo...) para resaltar el marcaje obtenido, eliminando posible ruido.
3. Binariza la imagen, limitando el tamaño de las partículas para obtener la plantilla de núcleos de la región de interés.
4. Realiza la proyección máxima de los planos elegidos en el canal con marcaje IB4 y trata la imagen para resaltar el marcaje, eliminando el posible ruido.
5. Duplica la imagen del marcaje obtenido y le aplica un filtro de alto suavizado para restarlo al marcaje original tratado y eliminar aún más ruido de fondo.
6. Binariza la imagen obtenida del marcaje para microglía y realiza un análisis de partículas aplicando una restricción mínima de tamaño.
7. Crea la imagen intersección de las partículas identificadas como núcleo y aquellas que presentan marcaje para IB4, limitando así la consideración de microglía a aquellas células con núcleo.
8. Registra todas las partículas reconocidas como núcleos y analiza únicamente aquellas con marcaje de IB4, obteniendo el número total de núcleos celulares y el número de células microgliales.

La siguiente tabla muestra la secuencia de comandos utilizada en el procesado de la imagen, con una breve explicación de su aplicación:

<i>macro "microglía [6]" {</i>	Identifica la macro, crea un atajo de teclado pulsando la tecla "6" e indica el inicio de la macro.
<i>print("Hi");</i>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<i>print("Initiating...");</i>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<i>saveAs("Tiff", "raw.tif");</i>	Guarda la imagen activa con los parámetros ("formato", "nombre.extensión") definidos.
<i>run("Split Channels");</i>	Separa los canales de la imagen activa.
<i>run("Set... ", "zoom=5");</i>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<i>selectWindow("C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>run("Set... ", "zoom=5");</i>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<i>run("Z Project...", "start=1 stop=10 projection=[Max Intensity]");</i>	Realiza la proyección máxima de los planos.
<i>run("Duplicate...", "title=[duplinucleos]");</i>	Duplica la ventana activa y la renombra.
<i>selectWindow("duplinucleos");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>run("Set... ", "zoom=5");</i>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<i>selectWindow("C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>close();</i>	Cierra la ventana activa.
<i>selectWindow("MAX_C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>setTool("polygon");</i>	Selecciona la herramienta "polígono".
<i>print("Nucleos image preprocessed");</i>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<i>waitForUser ("User input", "Selecciona área sin meninges y DESPUÉS pulsa OK");</i>	Detiene la macro hasta que el usuario seleccione la sección sin meninges y pulse la casilla "OK".
<i>run("Median...", "radius=2");</i>	Aplica un filtro tipo mediana de radio=2.
<i>run("Subtract Background...", "rolling=30");</i>	Resta el fondo de la imagen activa aplicando un suavizado de valor 30.
<i>run("Multiply...", "value=2");</i>	Multiplica la intensidad a la imagen activa por el valor entrecomillado.
<i>run("Subtract Background...", "rolling=30");</i>	Resta el fondo de la imagen activa aplicando un suavizado de valor 30.
<i>roiManager("Add");</i>	Contabiliza y localiza las partículas de la imagen activa.
<i>run("Make Binary");</i>	Binariza la imagen activa.
<i>run("Watershed");</i>	Separa las partículas dobles de la imagen binarizada activa según el algoritmo "Watershed".
<i>roiManager("Select", 0);</i>	Selecciona el primer registro añadido al ROI manager.
<i>run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks clear add");</i>	Analiza las partículas contenidas en la imagen que cumplan los criterios de tamaño y circularidad descritos. Además, crea una máscara con los resultados.

<code>print("Mask of MAX_C1-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>selectWindow("C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Set... ", "zoom=5");</code>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<code>run("Z Project...", "start=1 stop=10 projection=[Max Intensity]");</code>	Realiza la proyección máxima de los planos.
<code>run("Duplicate...", "title=[duplimarcaje]");</code>	Duplica la ventana activa y la renombra.
<code>selectWindow("duplimarcaje");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Set... ", "zoom=5");</code>	Minimiza el tamaño de la imagen activa.
<code>selectWindow("C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Median...", "radius=2");</code>	Aplica un filtro tipo mediana de radio=2.
<code>run("Subtract...", "value=25");</code>	Resta el valor entrecomillado de intensidad a la imagen activa.
<code>run("Multiply...", "value=2");</code>	Multiplica la intensidad a la imagen activa por el valor entrecomillado.
<code>run("Duplicate...", "title=[filtro]");</code>	Duplica la ventana activa y la nombra según el "title=nombre.extensión" definidos.
<code>selectWindow("filtro");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Median...", "radius=20");</code>	Aplica un filtro tipo mediana de radio=20.
<code>imageCalculator("Subtract create", "MAX_C2-raw.tif", "filtro");</code>	Crea una imagen nueva restando los elementos de la segunda foto a la primera foto; ambas especificadas entre comillas.
<code>print("Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>imageCalculator("Subtract create", "Result of MAX_C2-raw.tif", "filtro");</code>	Crea una imagen nueva restando los elementos de la segunda foto a la primera foto; ambas especificadas entre comillas.
<code>print("Result of Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>imageCalculator("Subtract create", "Result of Result of MAX_C2-raw.tif", "filtro");</code>	Crea una imagen nueva restando los elementos de la segunda foto a la primera foto; ambas especificadas entre comillas.
<code>print("Result of Result of Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<code>selectWindow("Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("Result of Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("Result of Result of Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>run("Make Binary");</code>	Binariza la imagen activa.
<code>run("Analyze Particles...", "size=1-infinite");</code>	Analiza las partículas contenidas en la

<i>circularity=0.00-1.00 show=Masks clear add");</i>	imagen que cumplan los criterios de tamaño y circularidad descritos. Además, crea una máscara con los resultados.
<i>print("Mask of Result of Result of MAX_C2-raw.tif");</i>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<i>imageCalculator("AND create", "Mask of MAX_C1-raw.tif", "Mask of Result of Result of MAX_C2-raw.tif");</i>	Crea una imagen nueva con la intersección de los elementos comunes de las fotos especificadas entre comillas.
<i>print("Result of Mask of MAX_C1-raw.tif");</i>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<i>run("Merge Channels...", "c3=[duplinucleos] c5=duplimarcaje create keep");</i>	Crea una imagen combinada de varias fotos en los canales especificados por el usuario.
<i>selectWindow("Composite");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>run("Stack to RGB", "");</i>	Convierte la imagen activa en formato RGB.
<i>selectWindow("duplimarcaje");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>close();</i>	Cierra la ventana activa.
<i>selectWindow("duplinucleos");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>close();</i>	Cierra la ventana activa.
<i>selectWindow("MAX_C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing add clear add");</i>	Analiza las partículas contenidas en la imagen que cumplan los criterios de tamaño y circularidad descritos.
<i>print("Mask of MAX_C1-raw.tif");</i>	Crea una ventana "log" que muestra el mensaje entre comillas.
<i>roiManager("Show All with labels");</i>	Muestra la localización de las partículas registradas sobre la imagen activa.
<i>roiManager("Show All");</i>	Muestra las partículas registradas en el <i>ROI Manager</i> sobre la imagen activa.
<i>selectWindow("Result of Mask of MAX_C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>roiManager("Select all");</i>	Selecciona todas las regiones de interés registradas en el ROI Manager.
<i>roiManager("Measure");</i>	Mide distintos parámetros en todas las regiones de interés registradas en el <i>ROI Manager</i> .
<i>selectWindow("Composite (RGB)");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>roiManager("Show All");</i>	Muestra las partículas registradas en el ROI Manager sobre la imagen activa.
<i>selectWindow("Result of Mask of MAX_C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>close();</i>	Cierra la ventana activa.
<i>selectWindow("MAX_C1-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<i>close();</i>	Cierra la ventana activa.
<i>selectWindow("Mask of Result of Result of MAX_C2-raw.tif");</i>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.

<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("Result of Result of Result of MAX_C2-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("filtro");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>selectWindow("Mask of MAX_C1-raw.tif");</code>	Selecciona la ventana con el nombre indicado entre comillas.
<code>close();</code>	Cierra la ventana activa.
<code>}</code>	Indicador de fin de la macro.

Tabla M.34. Macro para el conteo de microglía. La tabla muestra el código empleado para el conteo de microglía mediante análisis automatizado empleando el software ImageJ.

Conteo de astrocitos

Debido a la dificultad para definir el perfil celular de un astrocito, empleamos la intensidad del inmunomarcaje contra GFAP (recogida en el histograma de la imagen a analizar) para identificar estas células. Diferenciamos entre astrocitos quiescentes y reactivos considerando la intensidad del marcaje obtenido para GFAP en la proyección máxima de un número de planos constante e igual a tres en todos los casos. Tras analizar distintas secciones, distanciadas y cercanas al epicentro del trauma, establecimos un valor de intensidad de marcaje con GFAP mayor de 200 para astrocitos reactivos. Así pues, determinamos el incremento de reactividad glial según el número de píxeles con intensidad mayor de 200 en proporción al área de la sección analizada. Para ello:

1. Delimitamos el perímetro de la sección medular en estudio y obtuvimos su histograma.
2. Determinamos el número total del píxeles y el número de píxeles con una intensidad de marcaje GFAP entre 200 y 255.
3. Calculamos el porcentaje de píxeles considerados como astrocitos reactivos.

Llevamos a cabo el análisis en dirección rostral y caudal a la lesión para comprobar la evolución longitudinal de la cicatriz glial.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

REGRESIÓN DE COX

Este tipo de regresión permite evaluar tanto si un factor (el genotipo de los animales) influye en su capacidad para coordinar tras la LME como a qué tiempos ocurren estas diferencias. Para llevar a cabo este test es necesario descargar la librería “survival” disponible en la siguiente dirección web: <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/index.html> e instalarla en R (Paquetes>Instalar paquetes a partir de archivos .zip locales...).

Organización de los datos: para analizar los datos, creamos (en Microsoft Excel) un único archivo en formato .csv (texto delimitado por comas) con el nombre deseado (v.g.: Datos.csv) que contenga

toda la información a evaluar (código, tratamiento, tiempo hasta el evento, evento, etc.). La información deberá estar ordenada en columnas y en la primera fila deberá aparecer el nombre correspondiente a la variable de esa columna. La Tabla M.35 muestra la organización empleada en nuestros análisis.

Código	Genotipo	Tiempo	Evento	Ensayo
1	0	56	1	1
2	0	56	0	2
3	1	21	1	1
4	1	35	1	2

Tabla M.35. Ejemplo de fichero de datos para el análisis mediante la regresión de Cox. La tabla muestra la organización de datos necesaria para realizar el análisis utilizando el software R según las instrucciones descritas en el presente apartado. Código= indica el código del animal para su identificación; Genotipo= debe ser una variable dicotómica (v.g.: 0= SPL+/+; 1= SPL+/-); Tiempo= indica el primer día post-lesión al que se alcanza la coordinación o el tiempo final del ensayo; Evento= debe ser una variable dicotómica (v.g.: 0= No alcanza la coordinación; 1= Sí alcanza la coordinación); Ensayo= indica el número del ensayo.

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

Comando	Acción
<code>library(survival)</code>	Carga la librería "survival".
<code>datos<-read.csv2("coord.csv", header=TRUE)</code>	Reconoce el archivo de extensión .csv convirtiendo las "," decimales en "." y crea la matriz "datos".
<code>Datos</code>	Muestra los valores de la matriz "datos".
<code>coxph<-coxph(Surv(time, event) ~ gen + assay, method="breslow", datos)</code>	Aplica la regresión de Cox considerando "time" y "event" como variables independientes y "gen" como variable dependiente.
<code>summary(coxph)</code>	Muestra los resultados de la regresión de Cox.
<code>graph<-survfit(Surv(time, event) ~ gen, datos)</code>	Crea un archivo "graph" ajustando los datos a una curva de supervivencia según el modelo no paramétrico de Kaplan-Meier.
<code>plot(graph, xlab="Días post-operación", ylab="Coordinación (1-x)")</code>	Crea una gráfica del archivo "graph", especificando los títulos de los ejes.

Tabla M.36. Regresión de Cox. La tabla detalla el código utilizado para llevar a cabo la regresión de Cox empleando el software R.

DIAGRAMA DE CAJAS Y BIGOTES (BOX PLOT)

Esta representación permite examinar de una manera estandarizada la distribución de datos y detectar valores anómalos, o sospechosos, que difieren notablemente de la distribución mayoritaria de los datos.

Organización de los datos: para analizar los datos mediante *box plot*, creamos (en Microsoft Excel) un único archivo en formato .csv (texto delimitado por comas) con el nombre deseado (P.ej:

Datos.csv) que contenga toda la información del tejido a evaluar (tratamiento, ensayos, individuos, área de los picos...). La información deberá estar ordenada en columnas y en la primera fila deberá aparecer el nombre correspondiente a los datos de esa columna. La Tabla M.37 muestra a modo de ejemplo el modelo de organización necesario.

Tratamiento	Individuo	Análisis	CER	SM
Control	WT_264	2012	8193	1711
L1dpo	WT_261	2012	9417	2290
L3dpo	WT_258	2013	7829	2424

Tabla M.37. Ejemplo de fichero de datos para el análisis mediante box plot. La tabla muestra la organización de datos necesaria para realizar el análisis de Boxplot utilizando el software R según las instrucciones descritas en el presente apartado..

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

Comando	Acción
<code>datos<-read.csv2("Datos.csv", header=TRUE)</code>	Lee el archivo "Datos.csv" como un archivo .csv2 ³ ; header=TRUE indica que las columnas tienen cabecera.
<code>jpeg("NombreGráfico.jpg")</code>	Crea un archivo con formato .jpg
<code>boxplot (CER~Análisis, data=datos, main="título del gráfico", xlab="nombre eje X", ylab="nombre eje Y")</code>	Genera un gráfico del tipo "box plot" tomando los datos de la columna "CER" y considerando el factor "Análisis".
<code>dev.off()</code>	Guarda el gráfico creado.

Tabla M.38. Box plot. La tabla detalla el código utilizado para el análisis mediante Box plot empleando el software R.

TEST DE DIXON

El test de Dixon o Q-test es una herramienta habitual en la rama de química analítica para identificar datos anómalos en medidas repetidas. Para llevar a cabo este test es necesario descargar la librería "outliers" disponible en la siguiente dirección web: <https://cran.r-project.org/web/packages/outliers/index.html> e instalarla en R (Paquetes>Instalar paquetes a partir de archivos .zip locales...).

Organización de los datos: idéntica a la utilizada para el análisis mediante *box plot* descrito anteriormente. En este caso, es necesario tratar por separado los datos de los distintos ensayos (en nuestro estudio, analizamos por separado los datos de 2012 y 2013).

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

Comando	Acción
<code>library(outliers)</code>	Carga la librería "outliers".
<code>datos<-read.csv2("Datos.csv", header=TRUE)</code>	Lee el archivo "Datos.csv" como un archivo .csv2; header=TRUE indica que las columnas tienen cabecera.
<code>dixon.test(datos\$CER, type=0)</code>	Aplica el test de Dixon a la columna CER del archivo "datos", determinando por sí mismo el tipo de análisis.

Tabla M.39. Test de Dixon. La tabla detalla el código utilizado para el Test de Dixon empleando el software R.

NORMALIDAD Y HOMOCEDASTICIDAD

Los test estadísticos paramétricos (v.g.: test ANOVA, post-hoc Tukey...) tienen entre otros requisitos que los datos se ajusten a una distribución normal (sean normales) y que la varianza de sus residuos sea constante (homocedasticidad). Para evaluar la normalidad y homocedasticidad de los datos utilizamos el test de Shapiro y el test de Bartlett, respectivamente. En caso de que los datos no se ajusten a estos criterios, emplearemos test no paramétricos (v.g.: test múltiple de Wilcoxon, test de Kruskal-Wallis y post-hoc Conover).

Organización de los datos: idéntica a la utilizada para el análisis mediante *box plot* descrito anteriormente.

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la si-

Comando	Acción
<code>datos<-read.csv2("Datos.csv", header=TRUE)</code>	Lee el archivo "Datos.csv" como un archivo .csv2; header=TRUE indica que las columnas tienen cabecera.
<code>res<-aov(S1P~Tratamiento, data=datos)</code>	Realiza un ANOVA de una vía a la especie en estudio (v.g.: S1P) en función del factor "tratamiento".
<code>summary(res)</code>	Muestra los resultados obtenidos.
<code>shapiro.test(residuals(res))</code>	Aplica el test de Shapiro para determinar si los datos se ajustan a una distribución normal.
<code>bartlett.test(S1P~Tratamiento, data=datos)</code>	Aplica el test de Bartlett para determinar si los datos son homocedásticos.

Tabla M.40. Tests de normalidad y homocedasticidad de los datos. La tabla detalla el código utilizado para el análisis de la normalidad y homocedasticidad de datos empleando el software R.

- Si $p < 0,05$ en el test de Shapiro, rechazamos la distribución normal de los datos.
- Si $p < 0,05$ en el test de Bartlett, rechazamos la homocedasticidad de los datos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL TEST DE LA T DE STUDENT

Para determinar si existen diferencias significativas entre dos condiciones (por ejemplo, ratones transgénicos y silvestres), utilizamos el test de la "t" de Student.

Organización de los datos: idéntica a la utilizada para el análisis mediante *box plot* descrito anteriormente.

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

Comando	Acción
<code>datos<-read.csv2("Datos.csv", header=TRUE)</code>	Lee el archivo "Datos.csv" como un archivo .csv2; header=TRUE indica que las columnas tienen cabecera.
<code>t.test(Ct~Type, data=datos, var.equal=FALSE)</code>	Aplica un test t de Student. Si los datos analizados son homocedásticos, entonces: "var.equal=TRUE".

Tabla M.41. Test de la t de Student. La tabla detalla el código utilizado para el análisis mediante Box plot empleando el software R.

TEST ANOVA Y TEST POST-HOC DE TUKEY

Cuando los datos cumplen los requisitos de normalidad y homocedasticidad, empleamos el test ANOVA y el test post-hoc de Tukey para determinar si los valores de la variable dependiente difieren en función de los estados (más de dos) de la variable independiente (o factor). Para llevar a cabo estos tests es necesario descargar la librería "multcomp" disponible en la siguiente dirección web: <https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/index.html> e instalarla en R (Paquetes>Instalar paquetes a partir de archivos .zip locales...).

Organización de los datos: idéntica a la utilizada para el análisis mediante *box plot* descrito anteriormente.

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

Comando	Acción
<code>library(multcomp)</code>	Carga la librería "multcomp".
<code>datos<-read.csv2("Datos.csv", header=TRUE)</code>	Lee el archivo "Datos.csv" como un archivo .csv2; header=TRUE indica que las columnas tienen cabecera.
<code>res<-aov(S1P~Tratamiento, data=datos)</code>	Realiza un ANOVA de una vía a la especie en estudio (v.g.: S1P) en función del factor "Tratamiento". *Nota: para ANOVAs de más de una vía: <code>res<-aov(S1P~Tratamiento*dpo, data=datos)</code>
<code>summary(res)</code>	Muestra los resultados obtenidos.
<code>summary(glht(res, linfct=mcp(Tratamiento="Tukey")), test=adjusted(type="bonferroni"))</code>	Aplica el test de Tukey y considerando la corrección de Bonferroni.

Tabla M.42. Test ANOVA y test post-hoc de Tukey. La tabla detalla el código utilizado para el análisis estadístico empleando el test ANOVA y el test post-hoc de Tukey empleando el software R.

***Nota:** la corrección de Bonferroni (1995) restringe la probabilidad de que los cambios considerados significativos sean fruto del azar.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS Y TEST POST-HOC DE CONOVER

Cuando los datos no cumplen los requisitos de normalidad y homocedasticidad, analizamos si los valores de la variable dependiente muestran diferencias en función de los valores de una variable independiente con más de dos estados, empleando el test de Kruskal-Wallis y el test post-hoc de Conover. Para llevar a cabo estos tests es necesario descargar la librería “PMCMR” disponible en la siguiente dirección web: <https://cran.r-project.org/web/packages/PMCMR/index.html> e instalarla en R (Paquetes>Instalar paquetes a partir de archivos .zip locales...).

Organización de los datos: idéntica a la utilizada para el análisis mediante *box plot* descrito anteriormente.

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

Comando	Acción
<code>library(PMCMR)</code>	Carga la librería “PMCMR”.
<code>datos<-read.csv2("Datos.csv", header=TRUE)</code>	Carga el archivo a analizar.
<code>v1<-datos\$S1P</code>	Define la especie en estudio creando la variable “v1”.
<code>kruskal.test(v1~Tratamiento, data=datos)</code>	Aplica el test de Kruskal-Wallis a la variable “v1” considerando el factor “Tratamiento”.
<code>posthoc.kruskal.conover.test(v1~Tratamiento, data=datos, p.adj="BH")</code>	Aplica el test de Conover a la variable “v1” en función del factor “Tratamiento” y aplicando la corrección de Benjamini & Hochberg.

Tabla M.43. Test de Kruskal-Wallis y test post-hoc de Conover. La tabla detalla el código utilizado para el análisis estadístico empleando el test de Kruskal-Wallis y el test post-hoc de Conover empleando el software R.

TEST MÚLTIPLE DE WILCOXON

El análisis estadístico mediante un test múltiple permite analizar simultáneamente numerosas variables dependientes y comprobar si alguna de ellas cambia significativamente según la variable independiente establecida, ajustando los niveles de significación de cada comparación mediante correcciones como la de Bonferroni o el *False Discovery Rate* de Benjamini y Hochberg. El test de Wilcoxon es de tipo no paramétrico. Para llevar a cabo este test es necesario descargar la librería “multtest” disponible en la siguiente dirección web: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/multtest.html> e instalarla en R (Paquetes>Instalar paquetes a partir de archivos .zip locales...).

Organización de los datos: para este tipo de análisis es necesario generar en Microsoft Excel los siguientes archivos de datos:

- nombres.csv: contiene el nombre de las variables dependientes en una única columna y con una celda de encabezamiento.
- Datos.csv: contiene los datos de las variables dependientes para cada individuo o caso, encabezado por el nombre identificativo.

- **factor.csv**: codifica los estados de cada individuo o caso en una única columna. Encabezar la columna con "VAR".

A.	nombres	B.	Ind_1	Ind_2	Ind_3	Ind_4	C.	VAR
	SM16.0		543	543	343	489		Ctrl
	SM16.1		349	879	678	354		Ctrl
	SM18.0		567	356	979	846		dpo1
	SM18.1		879	653	868	844		dpo1

Tabla M.44. Ejemplo de ficheros para el análisis mediante el test múltiple de Wilcoxon. La tabla muestra la organización de los datos en los tres ficheros necesarios para realizar el análisis utilizando el software R según las instrucciones descritas en el presente apartado. El fichero A codifica los nombres de las variables dependientes, cuyos valores para cada individuo analizado (Ind_X) aparecen recogidos en el mismo orden en el fichero B. El fichero C codifica los estados de cada individuo (o caso) de forma que el individuo 1 y 2 del ejemplo corresponden a controles (Ctrl) mientras que los individuos 3 y 4 corresponden a lesiones de 1 día (dpo1).

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

Comando	Acción
<code>library(multtest)</code>	Carga en el programa la librería "multtest".
<code>datos<-read.csv2("Datos.csv", header=TRUE)</code>	Lee el archivo "Datos.csv" como un archivo .csv2; header=TRUE indica que las columnas tienen cabecera.
<code>names<-read.csv("nombres.csv", header=TRUE)</code>	Reconoce el archivo "nombres" y lo guarda como "names".
<code>trat<-read.csv("factor.csv", header=TRUE)</code>	Reconoce el archivo "factor" y lo guarda como "trat".
<code>trat<-factor(trat\$VAR)</code>	Nombra "trat" como el factor elegido.
<code>stat<-mt.teststat(datos, trat, test="f", nonpara="y")</code>	Aplica a "datos" el test "f" en función de "factor" considerando que se trata de datos no paramétricos (nonpara="y").
<code>p<-1-pf(stat, a, n-a)</code>	Obtiene la probabilidad asociada considerando los grados de libertad.
<code>pBH<-mt.rawp2adjp(p, "BH")</code>	Aplica la corrección de Benjamini&Hochberg.
<code>pBHord<-pBH\$adjp[order(pBH\$index),]</code>	Ordena de menor a mayor la probabilidad de Benjamini&Hochberg.
<code>res<-data.frame(names,stat,pBHord)</code>	Crea una tabla con los resultados.
<code>write.table(res, file="results.txt")</code>	Guarda los resultados como un archive .txt llamado "results".

Tabla M.45. Test múltiple de Wilcoxon. La tabla detalla el código utilizado para llevar a cabo el test múltiple de Wilcoxon empleando el software R. a= número de grupos -1, n=número de individuos-a.

REGRESIÓN LINEAL

Utilizamos la regresión lineal para comprobar si existe una relación entre dos variables continuas. De esta forma podemos, por ejemplo, evaluar si las concentraciones de dos especies de esfingolípidos cambian de forma proporcional, pudiendo establecer así una relación lineal entre ambas.

Organización de los datos: idéntica a la utilizada para el análisis mediante *box plot* descrito anteriormente.

Código utilizado: la secuencia de comandos utilizados para el análisis con el software R es la siguiente:

Comando	Acción
<code>datos<-read.csv2("Datos.csv", header=TRUE)</code>	Lee el archivo "Datos.csv" como un archivo .csv2; header=TRUE indica que las columnas tienen cabecera.
<code>res<-lm(SM16.0~SM16.1, data=datos)</code>	Realiza un ajuste lineal entre las especies seleccionadas (v.g.: SM16.0 y SM16.1)
<code>summary(res)</code>	Muestra los resultados obtenidos del ajuste.

Tabla M.46. Regresión lineal. La tabla detalla el código utilizado para el análisis de la relación lineal entre la SM16.0 y la SM16.1 empleando el software R.

El análisis reporta, entre otros datos, el valor de la pendiente de la recta, el valor de corte de la recta con el eje de ordenadas (Intercept), la R^2 ajustada y la probabilidad asociada.

CAPÍTULO I

Caracterización del sistema de esfingolípidos tras la lesión medular

INTRODUCCIÓN

Existen numerosas evidencias de la participación de los esfingolípidos tanto en patologías neurodegenerativas como en lesiones del sistema nervioso (ver Introducción). Sin embargo, apenas existen referencias bibliográficas que proporcionen información sobre los niveles de esfingolípidos en la médula espinal y, menos aún, sobre los cambios que suceden tras una lesión medular. Las escasas referencias existentes al respecto evalúan los niveles de especies individuales como la S1P (Kimura *et al.* 2007) o la contribución de especies concretas en la fisiopatología de la lesión medular (Kimura *et al.* 2007; Cuzzocrea *et al.* 2009; Pannu *et al.* 2005). El objetivo principal de este apartado es proporcionar una visión general del estado del sistema de esfingolípidos en la médula espinal y analizar posibles cambios que tengan lugar a diferentes tiempos tras una lesión medular traumática (LME).

Para alcanzar este objetivo determinamos la concentración de especies de esfingolípidos de las familias de esfingomielinas (SM), dihidroesfingomielinas (dhSM), ceramidas (Cer), dihidroceramidas (dhCer), glucosil/galactosilceramidas (GluCer) y lactosilceramidas (LacCer), así como de esfingosina (Sph), dihidroesfingosina (dhSph) y esfingosina 1-fosfato (S1P) en muestras de médula espinal procedentes de ratones de la cepa C57BL/6J, empleando un sistema de análisis basado en espectrometría de masas (*Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*; UPLC-MS). Las especies denominadas como “GluCer” en el presente estudio corresponden a cerebrósidos, es decir, la suma de glicoesfingolípidos sustituidos con un único residuo de glucosa (glucosíceramidas) o de galactosa (galactosíceramidas), ya que se trata de epímeros¹ y, por tanto, indistinguibles en el análisis mediante UPLC-MS.

Las muestras analizadas proceden de médula espinal de animales control (sin lesionar) y de animales lesionados muestreados a 1, 3, 7 y 21 días tras la lesión (días post-operación; dpo)². Adicionalmente, analizamos muestras de sangre y suero de los individuos estudiados para evaluar la posible contribución de esfingolípidos procedentes del suero o de las células sanguíneas a la composición de la médula espinal dañada y viceversa. El trauma provoca la rotura de vasos sanguíneos y la consecuente entrada de componentes sanguíneos (tanto moléculas como células) a la médula espinal durante los primeros días post lesión. Asimismo, se desencadena la respuesta inmune y alteraciones de la estructura y la actividad de la barrera hematoencefálica que conllevan la entrada de neutrófilos a la médula espinal en los primeros tiempos tras el trauma y posteriormente, la entrada de macrófagos y linfocitos. La muerte de células neurales, así como el aumento de poblaciones neurales específicas unido a la entrada de células exógenas provoca una variación de la composición celular en la médula espinal con respecto a la situación control (sin lesión) que podría ser la razón subyacente a los cambios en las concentraciones de esfingolípidos. Las alteraciones causadas por la lesión pueden, además, propiciar la extravasación de moléculas presentes en la médula espinal hacia el torrente sanguíneo. Por ello, empleamos muestras de suero para evaluar el potencial de los esfingolípidos como biomarcadores tempranos de lesión medular.

¹**Epímero:** estereoisómero de otro compuesto cuya configuración es diferente únicamente en uno de sus centros estereogénicos.

²**Días post-lesión:** el modelo de lesión medular por contusión empleado en el presente estudio se realiza previa cirugía (operación), por ello, se utilizará la nomenclatura “días post-operación (dpo)” como sinónimo de días post-lesión.

En este estudio, utilizamos un diseño experimental aleatorizado con una $n=3$ individuos/grupo. No obstante, debido a las dificultades para la extracción de muestras de suero, en algunos casos fue necesario ampliar el muestreo en un ensayo posterior, aprovechando para extraer muestras adicionales de médula espinal.

RESULTADOS

PROCESADO DE DATOS: CONTROL DE CALIDAD Y PREPARACIÓN DE MATRICES PARA SU ANÁLISIS

Los datos obtenidos tras el análisis de las muestras mediante UPLC-MS se recogen en las tablas del material suplementario (Sup.Mat. 1.A-C, pág. 279). Las tablas muestran en detalle las áreas de los picos de cada especie de esfingolípido analizada así como su relación masa/carga (m/z) y el tiempo de retención en el que se registra la elución del analito. Los datos relativos a las especies de tipo C12:0 y C17:0 corresponden en todos los casos a los estándares internos o patrones (“spikes”) de concentración conocida y naturaleza similar a la especie analizada, incorporados a las muestras durante el proceso de extracción para establecer la concentración de los esfingolípidos en estudio. Estos estándares internos sirven también como control de calidad, permitiendo evaluar la homogeneidad en el procesamiento de las muestras durante la extracción y el análisis. Los datos obtenidos para las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a estos “spikes” fueron los siguientes (Tabla R1.1):

Para evaluar la homogeneidad en el tratamiento, manipulación y análisis de las muestras, realizamos una primera evaluación de los datos de los “spikes” mediante diagramas de caja y bigotes (box & whisker plot o box plot; ver apartado correspondiente de materiales y métodos. Estas representaciones permiten examinar de una manera estandarizada la distribución de datos y detectar valores anómalos, o sospechosos, que se diferencien notablemente de la distribución mayoritaria de datos. Las gráficas individuales para cada “spike” se encuentran recogidas en la tabla (Tabla Sup.Mat. 2; pág. 282) del material suplementario. Los valores anómalos identificados en este análisis se resumen en la Tabla R1.2. Adicionalmente, realizamos un segundo análisis, también enfocado a evaluar la presencia de valores anómalos entre los “spikes”, empleando el test de Dixon o Q-test; una herramienta habitual en la rama de química analítica para el rechazo o la aceptación de datos en medidas repetidas. Al identificar un valor anómalo, lo eliminamos y repetimos el test para descartar la presencia de datos anómalos adicionales (para más información ver el apartado “Análisis mediante Dixon” de materiales y métodos). Los resultados de estos análisis, incluyendo los valores anómalos identificados, se detallan en el material suplementario (Sup.Mat. 3; pág. 284) y de forma resumida en la Tabla R1.2.

Como se aprecia en la Tabla R1.2., identificamos 20 “spikes” como potenciales “outliers” (valores anómalos) según el análisis mediante “box plot” y el test de Dixon. Decidimos, además, incluir en este grupo el valor del “spike” para SM correspondiente a los análisis de sangre del individuo WT_263 porque, aunque no fue detectado como anómalo por los tests realizados, su valor es considerablemente menor que el registrado en el resto de muestra equivalentes.

Tejido	Individuo	Análisis	"Spikes" para					
			Cer	SM	dhSM	GluCer	Sph	S1P
Médula espinal	WT_252	2012	5237	2020	-	2286	389	165
	WT_253	2012	5459	1554	-	2297	331	191
	WT_254	2012	7164	2546	-	2877	469	180
	WT_255	2012	6162	1482	-	1901	365	172
	WT_256	2012	5812	1962	-	1565	360	167
	WT_257	2012	7939	2122	-	2030	424	168
	WT_258	2012	7829	2424	-	1874	443	163
	WT_259	2012	7108	2175	-	1851	355	157
	WT_260	2012	5761	1154	-	1651	195	101
	WT_261	2012	9417	2290	-	3969	558	188
	WT_262	2012	6028	1930	-	2330	296	177
	WT_263	2012	8740	2280	-	2992	480	181
	WT_264	2012	8193	1711	-	1754	373	154
	WT_265	2012	6608	1585	-	1677	338	181
	WT_266	2012	8538	2146	-	2324	426	151
	#2	2013	3914	-	3276	2453	89	63
	#7	2013	7634	1042	8219	3163	293	186
	#8	2013	8062	1172	7902	2732	290	166
	#11	2013	7653	1166	7472	2636	284	168
	#12	2013	7089	1048	7114	2418	270	159
Sangre	WT_252	2012	4613	669	-	2360	148	F.S
	WT_253	2012	4572	453	-	2145	130	F.S
	WT_254	2012	4880	498	-	2266	120	F.S
	WT_255	2012	4594	516	-	2339	F.S	F.S
	WT_256	2012	4626	980	-	2469	F.S	175
	WT_257	2012	5356	844	-	2900	F.S	157
	WT_258	2012	4833	834	-	2604	F.S	156
	WT_259	2012	5162	396	-	2506	F.S	164
	WT_260	2012	5378	753	-	2943	F.S	181
	WT_261	2012	4697	831	-	2808	F.S	176
	WT_262	2012	4725	765	-	2643	F.S	137
	WT_263	2012	3489	134	-	2284	F.S	162
	WT_264	2012	5367	825	-	2844	F.S	155
	WT_265	2012	5291	803	-	2625	F.S	151
	WT_266	2012	5024	674	-	2301	F.S	136
Suero	WT_252	2012	4844	563	-	2270	359	97
	WT_253	2012	5035	600	-	2860	312	88
	WT_254	2012	5496	710	-	3079	365	180
	WT_255	2012	4218	438	-	2303	263	60
	WT_256	2012	4900	312	-	3138	370	92
	WT_257	2012	-	-	-	-	-	-
	WT_258	2012	-	-	-	-	-	-
	WT_259	2012	4919	294	-	2519	300	60
	WT_260	2012	-	-	-	-	-	-
	WT_261	2012	-	-	-	-	-	-
	WT_262	2012	-	-	-	-	-	-
	WT_263	2012	4122	597	-	2487	300	79
	WT_264	2012	5087	670	-	2746	302	58
	WT_265	2012	4498	511	-	2483	276	65
	WT_266	2012	4848	584	-	2825	324	61
	#2	2013	8973	1553	7628	1913	325	154
	#7	2013	4065	246	4152	2704	249	88
	#8	2013	3035	189	2994	2144	196	118
	#11	2013	3897	299	4015	2439	237	113
	#12	2013	3682	248	3692	2445	247	122

Tabla R1.1. Valores de los "spikes" analizados en cada muestra. En general, las formas insaturadas (dihidro-, vg- dihidro-ceramidas) se analizan empleando el mismo "spike" que sus equivalentes saturadas (i.e. ceramidas). El caso de las dihidro-esfingomielinas de las muestras analizadas en 2013 supone la única excepción ya que, a pesar de referirse también a la forma SM12:0, para la correcta detección de SM fue necesario diluir las muestras y realizar un segundo análisis. Como consecuencia, las dhSM presentan valores propios del "spike". F.S: fallo en el "spike".

Tejido	Muestreo	Animal	"Spikes" para					
			Cer	SM	dhSM	GluCer	Sph	S1P
Médula	2012	WT_260	-	-	-	-	195 ^b	101 ^{b,d}
		WT_261	-	-	-	3969 ^b	-	-
	2013	#2	3914 ^{b,d}	-	3276 ^{b,d}	-	89 ^{b,d}	63 ^{b,d}
		#7	-	-	-	3163 ^b	-	186 ^b
Sangre	2012	WT_263	3489 ^{b,d}	134 (?)	-	-	-	-
Suero	2012	WT_254	-	-	-	-	-	180 ^{b,d}
	2013	#2	8973 ^{b,d}	1553 ^{b,d}	7628 ^{b,d}	-	325 ^b	154 ^b
		#7	-	-	-	-	-	88 ^b
		#8	3035 ^b	-	2994 ^b	-	196 ^b	-

Tabla R1.2. Muestras con valores anómalos. La tabla resume las muestras y los "spikes" con valores anómalos según los boxplot (b) y el test de Dixon (d). Se incluye, además, el "spike" de la SM en la muestra de sangre del individuo WT_263 por su bajo valor (?).

Antes de tomar una decisión sobre la exclusión de muestras o individuos de acuerdo con los resultados de los controles de calidad, estudiamos individualmente cada uno de los casos identificados (Tabla R1.2). En este análisis "manual" evaluamos si las anomalías detectadas reflejan una tendencia común a las especies de la familia para la que el "spike" sirve como referencia, indicando un problema en la extracción, procesamiento o análisis de toda esta familia o si, por el contrario, indican un comportamiento anómalo exclusivo del "spike". Además, estudiamos el efecto de la normalización con respecto a cada "spike" para evaluar si tras la normalización, los datos resultantes eran congruentes con los valores de los otros ejemplares analizados dentro del mismo grupo. Es necesario destacar que las muestras provienen de animales por lo que no podemos obviar la variabilidad individual dentro de la población sea el motivo de las diferencias observadas. En el caso de que los valores normalizados difieran notablemente de los de otros individuos del mismo grupo y, además, resulten anómalos en el conjunto del análisis (diferentes grupos/días), consideramos esas medidas como no válidas, afectadas por una extracción y/o análisis anómalo, una posible pérdida del rango lineal en el análisis o factores indeterminados. En estos casos, decidimos eliminar los datos de la familia de esfingolípidos comprometida en la muestra. Por el contrario, si las anomalías sólo afectan al dato del "spike" o si los valores de concentración tras la normalización de la familia afectada no pueden considerarse anómalos, decidimos mantener los datos resultantes aplicando las correcciones necesarias. La evaluación individual y las decisiones tomadas para cada caso son:

- WT260 (Médula: Sph y S1P): los resultados normalizados no presentan ninguna anomalía como para ser excluidos de futuros análisis.
- WT261 (Médula: GluCer y LacCer): La anomalía sólo afecta al "spike" ya que los datos obtenidos para las especies de GluCer y LacCer presentan valores similares a los registrados para otros individuos del mismo grupo (1dpo). Como consecuencia, los valores de las especies se ven alterados al usar el "spike" como normalizador. Por tanto, asumimos algún tipo de problema específico en la medida del "spike" y decidimos sustituir su valor por la media de los valores de los "spikes" de los individuos del mismo grupo para normalizar los valores de este individuo.

- #7 (Médula: GluCer, LacCer y S1P; Suero: S1P): pese a que los “spikes” de estas familias muestran valores extremos en este individuo, los datos normalizados no presentan ninguna anomalía como para ser excluidos de posteriores análisis. La variación observada puede ser debida a diferencias en la eficiencia de extracción de esfingolípidos.
- #2 (médula y suero): en general, los valores de los “spikes” registrados tanto en médula espinal como en suero, fueron considerados anómalos por ambos tests. Al normalizar los datos, los valores difieren de los demás individuos del mismo grupo (7dpo) así como del resto de grupos, por lo que consideramos que las muestras en este caso estaban alteradas y decidimos excluir este individuo de cualquier análisis posterior.
- WT263 (Sangre: Cer y dhCer): los valores normalizados no presentan ninguna anomalía como para ser excluidos de futuros análisis.
- WT263 (Sangre: SM y dhSM): Los valores normalizados difieren notablemente de los resultados obtenidos en las muestras de los otros individuos del mismo grupo (1dpo). Consideramos que existe un posible problema en la extracción o el análisis de la muestra por pérdida del rango lineal. Los valores de estos esfingolípidos en esta muestra serán excluidos de cualquier estudio futuro.
- WT254 (Suero; S1P): el valor anormalmente elevado en este “spike” supone una notable reducción de los valores normalizados de S1P respecto a los valores registrados en los demás individuos del mismo grupo (21dpo). Por tanto, asumimos algún tipo de problema específico en la medida del spike y decidimos sustituir su valor por la media de los valores de los “spikes” de los individuos del mismo grupo para normalizar los valores de este individuo.
- #8 (Suero; Cer, dhCer, dhSM y Sph): la normalización afecta ligeramente a los resultados pero sin una diferencia considerable con respecto a otras muestras estudiadas del mismo grupo (3dpo). Por tanto, este valor será considerado en futuros análisis.

Una vez asegurada la homogeneidad en el tratamiento, la manipulación y el análisis de las muestras mediante el control de calidad, fue necesario hacer un filtrado de datos adicional debido a la ausencia de datos de especies minoritarias en diversos individuos. La disparidad en el número de datos disponibles de cada muestra supone un problema para ulteriores estudios estadísticos, por lo que excluimos aquellas especies que no tuviesen una representación completa en todos los individuos analizados de un mismo tejido. De acuerdo con este criterio, las decisiones tomadas y las especies y/o muestras eliminadas fueron las siguientes:

- **Médula espinal:** excluimos los datos de las muestras de médula espinal analizadas en el segundo experimento (año 2013) ya que presentan numerosas diferencias en el número de especies detectadas entre experimentos. Esta disparidad puede ser debida a diferencias en la sensibilidad/límite de detección del equipo utilizado. Considerando que la exclusión de estos resultados no pone en peligro la representación muestral de $n=3$ individuos/grupo, decidimos considerar en los análisis estadísticos únicamente los datos de la muestras del primer grupo experimental (2012) y excluir de futuros análisis los datos de los individuos analizados en el segundo experimento (2013).
- **Sangre:** eliminamos las especies LacCer14:0, LacCer18:0, LacCer20:0 y LacCer22:0 debido a que su representación no es completa en los grupos analizados. Las especies Sph y

dhSph también fueron eliminadas debido a problemas en la detección de su “spike”. En el caso concreto de S1P, a pesar de la falta de datos para el individuo WT_255 (7dpo) y para los tres individuos de 21dpo (WT_252, WT_253 y WT_254), decidimos mantener estos datos puesto que su representación a tiempos tempranos tras la lesión podría proporcionar información relevante.

- **Suero:** eliminamos las especies SM14:1, dhSM14:0, dhSM24:1, Cer14:0, Cer24:1, dhCer18:0, dhCer20:0, dhCer24:1, GluCer24:2, LacCer22:0 y dhSph debido, como en el caso anterior, a una representación incompleta en los individuos analizados.

Tras aplicar los controles de calidad y demás criterios previamente descritos, normalizamos los datos filtrados con respecto a su “spike” correspondiente y a la cantidad de muestra analizada (en mg en médula espinal y mL para sangre y suero) para determinar la concentración de cada especie de esfingolípido (pmoles/mg o pmoles/mL). Los valores de concentración de cada especie en cada muestra, así como el sumatorio por familias de esfingolípidos se detallan en el material suplementario (Sup.Mat. 4.A-C; Pág. 285). Estos serán los datos empleados para los análisis posteriores de la concentración de esfingolípidos y sus cambios en muestras de médula espinal, sangre y suero en el modelo de lesión medular por contusión estudiado. En estas tablas no se incluyen aquellas especies de esfingolípidos que no fueron detectadas en ninguna muestra, concretamente: Cer 14:0, Cer 20:1, Cer 24:1, dhCer 14:0 y LacCer 14:0 en el caso de médula espinal; Cer14:1, Cer20:1, Cer24:1, dhCer14:0, GluCer14:0, GluCer22:1, GluCer24:1, GluCer24:2 y LacCer14:0 en sangre y; Cer14:1, Cer20:1, dhCer14:0, LacCer14:0, LacCer18:0 y LacCer20:0 en suero.

MÉDULA ESPINAL, SANGRE Y SUERO PRESENTAN PERFILES ESFINGOLÍPIDICOS CARACTERÍSTICOS

En base a los datos obtenidos en el análisis mediante UPLC-MS (Sup.Mat. 4.A-C, Pág. 285), analizamos el perfil característico de esfingolípidos en las diferentes muestras según la proporción en la que participan las distintas familias en relación al total de esfingolípidos analizados.

En el caso de médula espinal destaca que todas las muestras presentan un perfil similar, caracterizado por un elevado porcentaje de esfingomielinas (SM), representando aproximadamente el 50% del total de esfingolípidos, y de cerebrósidos (GluCer), con un porcentaje superior al 30% (Tabla R1.3; ver también Figura R1.1). El 20% restante está compartido entre las especies de las demás familias, mayormente dhSM (5-7%) y Cer (2-3%). Este perfil se mantiene a pesar de la LME, por lo que podemos concluir que la lesión medular no altera el patrón de esfingolípidos en médula espinal.

	Porcentaje									Conc. Total (pmol/mL)
	SM	dhSM	Cer	dhCer	GluCer	LacCer	Sph	dhSph	S1P	
Ctrl	51.88	6.70	2.04	0.05	37.97	0.12	0.44	0.13	0.31	1665.53
1dpo	53.51	6.63	3.16	0.09	35.16	0.09	0.39	0.13	0.25	1544.64
3dpo	51.34	7.21	3.14	0.08	36.16	0.15	0.94	0.23	0.31	1818.07
7dpo	51.77	6.71	2.26	0.05	36.46	0.13	0.75	0.20	0.84	2573.45
21dpo	58.23	5.91	2.77	0.06	30.40	0.10	1.16	0.31	0.72	2564.30

Tabla R1.3. Abundancia total de esfingolípidos y porcentaje por familias en médula espinal a diferentes tiempos post-operación. Los datos están expresados como la mediana de los valores de los tres individuos analizados por cada grupo. Ctrl=Control; Dpo=días post-operación; Conc.=concentración.

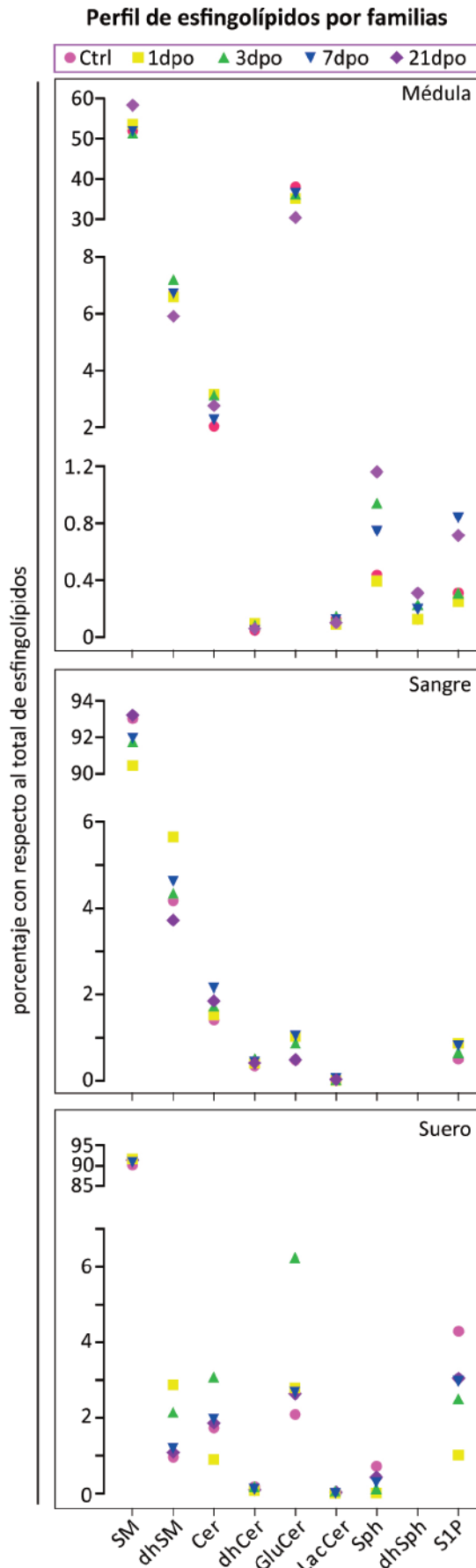


Figura R1.1. Perfil de esfingolípidos de médula espinal, sangre y suero. La gráfica muestra los porcentajes de las distintas familias con respecto al total de esfingolípidos, antes de la lesión medular y a 1, 3, 7 y 21 días post operación (dpo).

Al analizar en detalle las especies de cada familia (Sup.Mat. 4.A; Pág. 285), observamos que las especies con residuos de ácidos grasos saturados de 18 carbonos (C18:0, ácido esteárico u octodecanoico) son mayoritarias en todas las familias de esfingolípidos analizadas. De manera similar, las especies con ácidos grasos monoinsaturados de 24 carbonos (C24:1, posiblemente ácido nervónico propio de la vaina de mielina) también presentan valores muy elevados en todas las familias a excepción de LacCer, en la cual predomina la especie C16:0 (ácido palmítico o hexadecanoico) junto con la especie C18:0. Además de éstas, las especies C24:0 (ácido lignocérico o tetracosanoico) presentan altos porcentajes en las familias Cer, dhCer y GluCer.

La sangre también presenta un perfil de esfingolípidos característico que se conserva tras la LME (Sup.Mat. 4.B, Pág. 286). Sin embargo, el perfil de sangre difiere considerablemente del perfil de médula espinal. En las muestras de sangre, la familia de las SM representa más de un 90% del total de esfingolípidos (Tabla R1.4, Figura 1.1) mientras que las especies de ceramidas con residuos de glucosa o galactosa (GluCer) apenas constituyen un 1% del total de esfingolípidos. Los esfingolípidos mayoritarios corresponden a especies C24:1 para las familias de SM, dhSM, Cer y dhCer; especies C24:0 en las familias de SM, Cer, dhCer y GluCer; especies C16:0 para SM, dhSM y LacCer y, adicionalmente, la especie C22:0 en el caso de Cer.

	Porcentaje								Conc. Total (pmol/mL)
	SM	dhSM	Cer	dhCer	GluCer	LacCer	Sph	S1P	
Ctrl	93.00	4.18	1.41	0.35	0.48	0.04	-	0.51	234271.46
1dpo	90.47	5.65	1.54	0.41	1.03	0.03	-	0.87	277479.15
3dpo	91.75	4.35	1.73	0.52	0.86	0.03	-	0.64	240053.01
7dpo	91.97	4.63	2.15	0.43	1.05	0.05	-	0.81	198034.17
21dpo	93.24	3.72	1.84	0.41	0.49	0.03	-	-	207378.55

Tabla R1.4. Abundancia total de esfingolípidos y porcentaje por familias en sangre a diferentes tiempos post-operación. Los datos están expresados como la mediana de los valores de los tres individuos analizados por grupo. Ctrl= Control; Dpo=días post-operación; Conc.=concentración.

El perfil de esfingolípidos en suero tampoco se ve afectado a consecuencia de la LME. Se caracteriza por un elevado porcentaje de SM, mayor del 85% en todos los casos, y una proporción de GluCer que oscila entre el 2-6% del total de esfingolípidos (Tabla R1.5, Figura R1.1). Esta proporción de GluCer es superior a la registrada en muestras de sangre, aunque sus niveles distan mucho de los observados en el perfil de médula espinal. En este caso, las especies mayoritarias en las familias SM y dhSM, al igual que en sangre, son las especies con un residuo graso de ácido palmítico (C16:0; ver Sup.Mat. 4.C; Pág. 287). Asimismo, ambos tejidos comparten una elevada proporción de especies con ácidos grasos de cadena muy larga, siendo mayoritarias las especies C24:0 en las familias de Cer, dhCer y GluCer, y las especies insaturadas C24:1 en el caso de Cer, GluCer y SM.

	Porcentaje								Conc. Total (pmol/mL)
	SM	dhSM	Cer	dhCer	GluCer	LacCer	Sph	S1P	
Ctrl	90.17	0.95	1.70	0.16	2.08	0.00	0.71	4.30	73005.25
1dpo	91.82	2.88	0.91	0.07	2.81	0.01	0.03	1.04	248360.22
3dpo	85.69	2.16	3.07	0.18	6.25	0.05	0.11	2.48	58168.18
7dpo	90.72	1.19	2.03	0.10	2.72	0.02	0.28	2.97	87601.59
21dpo	91.52	1.06	1.89	0.08	2.63	0.03	0.43	3.07	82163.98

Tabla R1.5. Abundancia total de esfingolípidos y porcentaje por familias en suero a diferentes tiempos post-operación. Los datos están expresados como mediana de los valores de los tres individuos analizados para cada tiempo post-operación (dpo). En el caso el porcentaje referente a S1P excluimos el individuo WT_254 (7dpo) ya que su "spike" fue detectado como anómalo en el control de calidad previo. Sin embargo, no fue excluido en la sumatoria total, ya que su aportación supone el 2.42% de las especies presentes en suero en este individuo y no supone cambio alguno en el cálculo global. Ctrl= Control; Dpo=días post-operación; Conc.=concentración.

Al representar gráficamente los perfiles de esfingolípidos de los tres tipos de tejidos analizados (Figura R1.1) se observa que la proporción de las familias de esfingolípidos en las muestras de médula, sangre y suero son claramente diferentes entre sí, generando un patrón característico de esfingolípidos para cada muestra que, además, se mantiene a diferentes días post-LME. No obstante, una exploración a este nivel no permite evaluar los cambios puntuales que experimenten algunas especies de esfingolípidos; esta posibilidad será evaluada de forma detallada en apartados posteriores relativos a las variaciones del sistema de esfingolípidos tras la lesión medular.

CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS EN MÉDULA ESPINAL TRAS LA LESIÓN

La lesión no altera la concentración total de esfingolípidos...

Considerando que el perfil característico de las muestras se mantiene tras la LME, decidimos evaluar si la concentración total de esfingolípidos en la médula espinal también permanece constante o si, por el contrario, varía en los diferentes días post-LME estudiados. Al graficar los datos de las muestras de médula espinal se observan ligeras variaciones en la concentración total de esfingolípidos caracterizadas por una tendencia al aumento a lo largo del tiempo post lesión (Figura R1.2). Para determinar si estos cambios son estadísticamente significativos, empleamos un test ANOVA de una vía (tras confirmar la normalidad y homocedasticidad de los datos; datos no mostrados; para más información sobre el análisis ver el apartado correspondiente de Materiales y Métodos). Los resultados demuestran que las variaciones observadas no son estadísticamente significativas ($F_{(4,10)}=1,272$, $p=0,343$) y, por tanto, que la lesión medular no altera de manera sensible la concentración total de esfingolípidos, al igual que ocurre con su perfil.

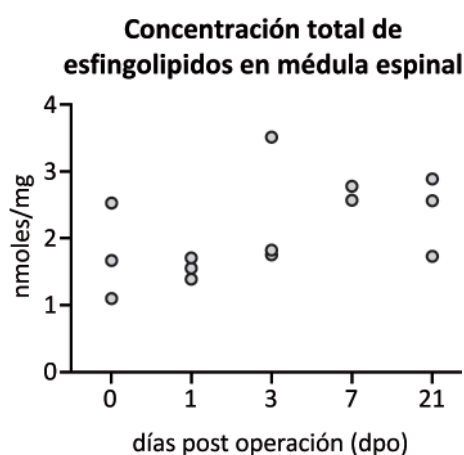


Figura R1.2. Concentración total de esfingolípidos en la médula espinal a diferentes días post-operación. La figura muestra la concentración total de esfingolípidos (nmol/mg) que presentan los distintos individuos analizados en función de los días post-LME.

... pero sí la concentración de especies individuales

Además de evaluar el efecto sobre el total de esfingolípidos, nos planteamos utilizar el test ANOVA de una vía para extender estos análisis al efecto de la lesión sobre la concentración de las diferentes especies de esfingolípidos. Sin embargo, al evaluar los requisitos de normalidad y homocedasticidad necesarios para este test, comprobamos que los datos de la mayoría de especies analizadas no cumplen estas premisas (datos no mostrados), por lo que llevamos a cabo el análisis estadístico utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con un factor de corrección FDR (*false discovery rate*; Benjamini & Hochberg, 1995). En la Tabla R1.6 se muestran las especies que presentan cambios significativos de concentración tras la LME según los resultados de este análisis.

Los resultados permiten identificar once especies que cambian su concentración significativamente tras la LME. La mayoría de especies que experimentan cambios significativos corresponden a esfingolípidos N-acilados con un residuo de ácido palmítico (C16:0), especies mayoritarias en muestras de sangre y suero. Además de estos cambios, también varía significativamente la concentración de los metabolitos más sencillos dhSph, Sph y S1P, así como de algunas especies de

Especie	F _(4, 10)	p	pBH
Cer16:1	24,423	0,000	0,001
dhSM16:0	19,840	0,000	0,001
Sph	18,929	0,000	0,001
SM16:1	17,311	0,000	0,002
dhSph	16,591	0,000	0,002
SM16:0	12,289	0,000	0,005
LacCer24:0	8,771	0,002	0,016
S1P	8,913	0,002	0,016
dhCer16:0	7,944	0,003	0,021
Cer16:0	6,792	0,005	0,032
LacCer16:0	6,735	0,005	0,032

Tabla R1.6. Especies con cambios significativos de concentración en médula espinal tras una LME. La tabla detalla los esfingolípidos que presentan cambios significativos de concentración (p ajustada o $pBH < 0.05$). Calculamos el estadístico F de Fisher-Snedecor adaptado para datos no paramétricos según se implementa en la librería “multest” del software R. La “ p ” corresponde a la probabilidad del análisis sin corregir por contrastes múltiples, mientras que “ pBH ” indica la probabilidad ajustada tras aplicar la corrección de Benjamini & Hochberg (1995).

SM y Cer con residuo C16:1 y LacCer con residuo 24:0. La única especie mayoritaria en médula espinal que experimenta cambios significativos tras la LME es la LacCer16:0. A pesar de que la familia de las GluCer es la segunda familia más abundante en médula espinal, ninguna de las especies estudiadas de esta familia muestra variaciones significativas. Seguidamente, analizamos en detalle estos cambios en el contexto de la ruta metabólica de los esfingolípidos.

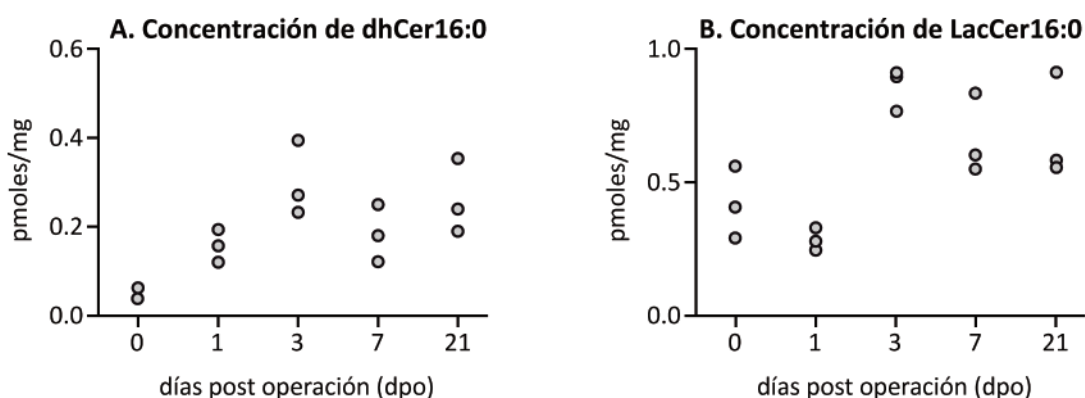


Figura R1.3. Patrones representativos del cambio de concentración de esfingolípidos N-acilados C16. La figura muestra, a modo de ejemplo, el perfil de cambio en médula espinal que presentan las especies dhCer16:0 (A) y LacCer16:0 (B). Este perfil se diferencia, básicamente, en la concentración a 1dpo que, en algunos casos muestra un ligero incremento (A), mientras que en otros la concentración se mantiene a concentraciones similares a las observadas en ausencia de lesión (B).

LOS CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS N-ACILADOS C16 TRAS LA LME ESTÁN INTERRELACIONADOS

Las concentraciones de los esfingolípidos N-acilados con cambios significativos tras la lesión medular siguen, en general, un patrón común a tiempos tempranos post-lesión caracterizado por una tendencia al aumento de concentración, alcanzando su máximo a 3dpo (Figura R1.3).

Dentro de este patrón general, algunas especies presentan una tendencia inicial al aumento de la concentración a 1dpo mientras que otras mantienen niveles similares o ligeramente inferiores a los registrados en ausencia de lesión medular, haciendo aún más notable el aumento de concentración observado a 3dpo. Posteriormente, la concentración disminuye ligeramente a 7dpo para mantenerse, o aumentar ligeramente, a 21dpo sin alcanzar los máximos registrados a 3dpo. El análisis de estos cambios mediante un test post-hoc de Conover para datos no paramétricos confirman que el aumento de concentración registrado a 3 dpo es significativo y, en bastantes casos, también los cambios que se producen a 7 y 21dpo (Tabla R1.7).

Especie	Días post operación						Especie
		Ctrl	1dpo	3dpo	7dpo	21dpo	
SM16:0 $\chi^2_{(4)}=11.633$ $p=0.0203$	1dpo	0.586	0.588	0.001*	0.017*	0.001*	SM16:1 $\chi^2_{(4)}=12.233$ $p=0.0157$
	3dpo	0.003*	0.005*	0.001*	0.033*	0.001*	
	7dpo	0.019*	0.042*	0.205	0.021*	0.832	
	21dpo	0.002*	0.002*	0.411	0.049*	0.026*	
dhSM16:0 $\chi^2_{(4)}=12.433$ $p=0.0144$	1dpo	0.081	0.096	0.005*	0.049*	0.007*	dhCer16:0 $\chi^2_{(4)}=10.649$ $p=0.03081$
	3dpo	<0.001*	0.001*	0.044*	0.493	0.075	
	7dpo	0.002*	0.042*	0.015*	0.075	0.493	
	21dpo	<0.001*	0.004*	0.138	0.138	0.181	
Cer16:0 $\chi^2_{(4)}=10.233$ $p=0.03668$	1dpo	0.137	0.028*	<0.001*	0.003*	<0.001*	Cer16:1 $\chi^2_{(4)}=12.7$ $p=0.01284$
	3dpo	0.008*	0.075	<0.001*	0.160	0.006*	
	7dpo	0.075	0.527	0.149	0.002*	0.037*	
	21dpo	0.008*	0.077	0.885	0.166	0.051	
LacCer16:0 $\chi^2_{(4)}=10.21$ $p=0.03704$	1dpo	0.264	0.379	0.013*	0.016*	0.092	LacCer24:0 $\chi^2_{(4)}=10.895$ $p=0.02777$
	3dpo	0.024*	0.010*	0.006*	0.006*	0.020*	
	7dpo	0.155	0.024*	0.264	0.746	0.206	
	21dpo	0.114	0.024*	0.324	0.773	0.230	

Tabla R1.7. Cambios significativos en la concentración de esfingolípidos a diferentes tiempos post-operación (Test de Conover). La tabla muestra la probabilidad ajustada (corrección de Benjamini & Hochberg) de que los cambios observados a distintos días post-operación sean significativos. Los datos referidos a las especies de la derecha se marcan en casillas sombreadas. El valor χ^2 corresponde al valor del estadístico según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. El símbolo (*) indica una $p(BH)<0,05$ para facilitar la visualización de los datos.

Teniendo en cuenta la uniformidad en los patrones de cambio de concentración de las especies con residuos de ácido palmítico (C16:0) tras la LME y considerando las interconversiones descritas entre familias dentro de la ruta metabólica de esfingolípidos (Figura R1.4), decidimos explorar si los cambios en la concentraciones de estas especies podrían estar relacionados. Para ello, empleamos el método de regresión lineal para evaluar la relación entre las concentraciones de: especies de familias directamente conectadas (v.g.: dhSM y dhCer); especies de familias cuya conversión requiere la síntesis de especies intermedias (v.g.: SM y LacCer); especies de la misma familia que difieren

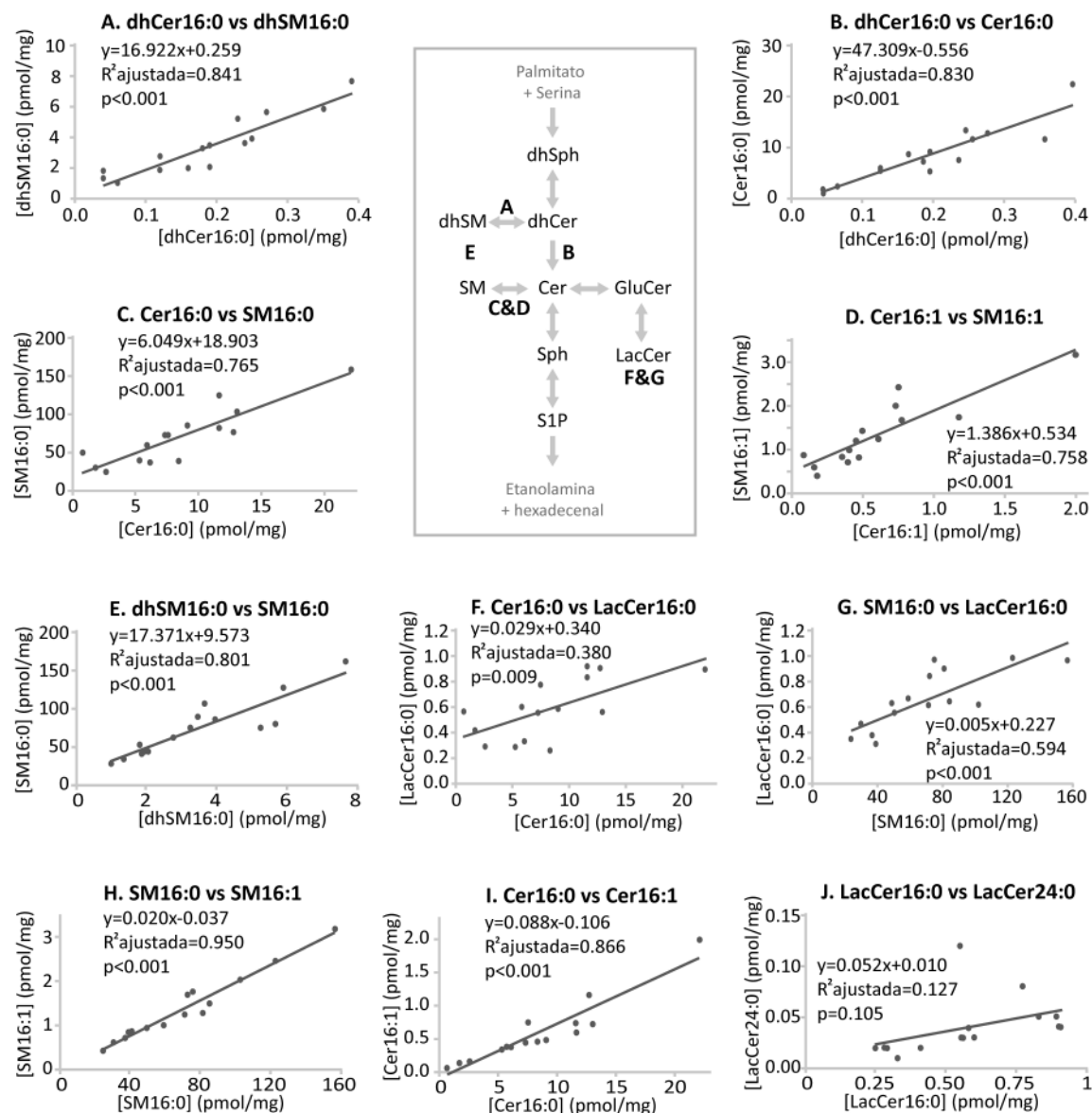


Figura R1.4. Relaciones entre esfingolípidos N-acilados con cambios significativos tras la lesión medular. La figura muestra la relación entre las concentraciones de pares de especies de esfingolípidos con diferentes relaciones metabólicas (A a G) según ruta ilustrada en el centro de la figura (modificada de Hannun et al, 2008). Se incluyen además las relaciones entre especies de una misma familia con diferente residuo de ácido graso (H, I y J).

únicamente en una insaturación (v.g. SM16:0 y SM16:1) y especies de la misma familia pero con un residuo graso distinto (LacCer16:0 y LacCer24:0).

Al analizar las especies con residuo C16 de familias directamente relacionadas según la ruta metabólica observamos que la relación lineal entre ellas es, en todos los casos, significativa y explica un alto porcentaje de la variación de los datos ($R^2_{ajustada}$). Así, la relación entre las concentraciones de dhCer16:0 y su precursor dhSM16:0 (Figura R1.4.A) es claramente significativa ($p = 9.349 \cdot 10^{-7}$) y explica cerca del 85% de las variaciones de concentración de la dhCer16:0 ($R^2_{adj} = 0.841$). Igual ocurre entre la especie dhCer16:0 y el producto resultante de su desaturación, la Cer16:0 ($R^2_{adj} = 0.830$;

$p=1.425 \cdot 10^{-6}$; Figura R1.4.B) y entre las especies SM16:0 y Cer16:0 ($R^2_{adj}=0.765$ y una $p=1.218 \cdot 10^{-5}$; Figura R1.4.C). La relación también se mantiene en el caso de las especies con residuos insaturados SM16:1 y Cer16:1 ($R^2_{adj}=0.758$; $p=1.478 \cdot 10^{-5}$; Figura R1.4.D).

Esta estrecha relación entre concentraciones también se observa en esfingolípidos C16:0 más alejados en la ruta metabólica, como en el caso de dhSM16:0 y SM16:0 ($R^2_{adj}=0,801$; $p=4,024 \cdot 10^{-6}$; Figura R1.4.E) que, pese a diferir en una única insaturación en su esqueleto esfingoide, requiere la transformación de dhSM en dhCer y Cer para dar lugar a SM. Asimismo, la relación entre concentraciones se mantiene significativa cuando se incluyen en el análisis las lactosil ceramidas (LacCer), que implican glicosilaciones, aunque el nivel de variabilidad explicada por la regresión disminuye drásticamente. Así, sólo el 38% de la variabilidad de la concentración de LacCer16:0 ($R^2_{adj}=0,380$; $p=8,545 \cdot 10^{-3}$; Figura R1.4.F) es explicada por la concentración de Cer16:0, su precursor más directo con variaciones de concentración significativas tras la LME. Curiosamente esta relación es más estrecha entre LacCer16:0 y SM16:0 ($R^2_{adj}=0,594$; $p=4,701 \cdot 10^{-4}$; Figura R1.4.G) a pesar de que su interconversión requiere necesariamente un paso a través de Cer16:0 según la ruta metabólica comúnmente aceptada.

La concentración de especies de la misma familia que difieren únicamente en una insaturación también se encuentra estrechamente relacionada. Así, en el caso de SM16:0 y SM16:1, y de forma un poco más limitada en el caso de las ceramidas Cer16:0 y la Cer16:1, comprobamos que los valores de ajuste y probabilidad reportados ($R^2_{adj}=0,950$; $p=5,066 \cdot 10^{-10}$; Figura R1.4.H y $R^2_{adj}=0,866$; $p=3,078 \cdot 10^{-7}$; Figura R1.4.I, respectivamente) son incluso mayores que los observados entre especies con un mismo residuo de familias conectadas. Sin embargo, la relación entre las concentraciones desaparece en el caso de las lactosilceramidas LacCer C16:0 y LacCer C24:0 ($R^2_{adj}=0,1272$; $p=0,105$; Figura R1.4.J) que, pese a ser de la misma familia, están aciladas con un ácido graso diferente.

En resumen, estos resultados muestran que las concentraciones de prácticamente todas las especies de esfingolípidos N-aciladas que presentan cambios significativos tras la LME están estrechamente relacionadas. Esta relación se mantiene para especies de familias cuya conversión es directa metabólicamente, así como para especies de familias cuya conversión requiere la síntesis de especies intermedias y entre especies que únicamente difieren en una insaturación. Sin embargo, la relación lineal se pierde completamente cuando se analizan especies aciladas con ácidos grasos que difieren en el número de carbonos.

LA CONCENTRACIÓN DE Sph ESTÁ ESTRECHAMENTE RELACIONADA CON LA DE dhSph

Además de las formas N-aciladas, los análisis desvelaron la existencia de cambios significativos en las bases esfingoides esfingosina y dihidroesfingosina. Los cambios de concentración tras la lesión en estos metabolitos son similares pero diferentes a los observados para las especies N-aciladas (Figura R1.5.A). En ambas especies se observa una ligera disminución no significativa de la concentración a 1dpo ($p>0,3$, ver Figura R1.5.C), seguida de un aumento estadísticamente significativo a 3dpo con respecto a la concentración de estas especies a 1dpo y en ausencia de lesión. A 7dpo, ambas especies mantienen concentraciones similares a las observadas a 3dpo, antes de aumentar nuevamente hasta alcanzar la máxima concentración a 21dpo, a diferencia de las formas aciladas que alcanzan su máximo a 3dpo. La similitud en los patrones de ambas especies se refleja la estrecha relación lineal entre sus concentraciones, alcanzando un valor de R^2 ajustada cercano a 1 ($R^2_{adj}=0,982$; $p=6,084 \cdot 10^{-13}$; Figura R1.5.B), a pesar de que la transformación de dhSph en Sph requiere varios pasos intermedios según la ruta metabólica de los esfingolípidos aceptada actualmente (Figura R1.4).

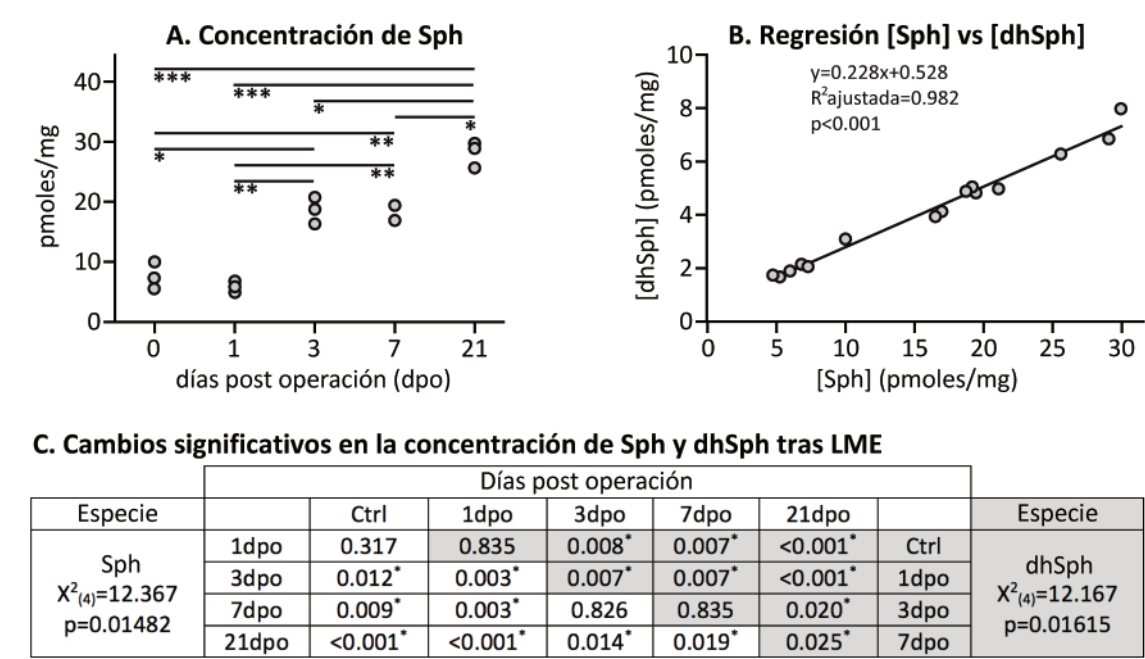
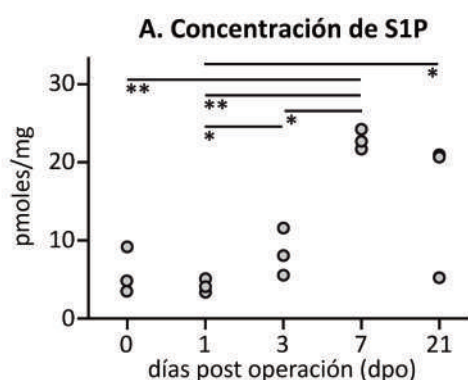


Figura R1.5. Cambios de concentración de Sph y dhSph en médula espinal y su correlación a diferentes tiempos tras la LME. A) La gráfica muestra los cambios de concentración de la Sph a diferentes días post-operación, cuyo patrón es prácticamente idéntico al que ocurre en el caso de la dhSph. Asimismo, se ilustran los cambios significativos identificados en función del test post-hoc de Conover para datos no paramétricos que se detallan en la tabla inferior. La probabilidad ajustada según la corrección de Benjamini & Hochberg (1995) se expresa según: (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$ y (***) $p<0,001$. B) La figura muestra la relación lineal ($R^2_{adj}=0,982$; $p=6,084 \cdot 10^{-13}$) entre la concentración de Sph y dhSph a diferentes días post-operación. C) La tabla muestra la probabilidad ajustada (con corrección de Benjamini & Hochberg) de que los cambios observados a distintos días post-operación sean significativos según el test post-hoc de Conover. Los datos referidos a la dhSph se marcan en casillas sombreadas. El valor χ^2 corresponde al valor del estadístico según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. El símbolo (*) indica una $pBH<0,05$ para facilitar la visualización de los datos.

LA S1P MUESTRA UN PATRÓN DE CAMBIO DE CONCENTRACIÓN PROPIO, RELACIONADO CON LA CONCENTRACIÓN DE Sph

La especie S1P, la forma fosfatada de Sph, también cambia significativamente en médula espinal a consecuencia de la LME. Para analizar la significación de los cambios, al igual que en los casos anteriores, utilizamos el test post-hoc de Conover para datos no paramétricos. En el caso particular de la S1P, el patrón de concentración tras la lesión es distinto al de las demás especies estudiadas. Como se aprecia en la Figura R1.6, la concentración de S1P en médula espinal a 1dpo se mantiene sin cambios respecto a la médula intacta ($p>0,3$) y, aunque aumenta ligeramente a 3dpo ($p>0,1$ respecto a control; $p<0,05$ respecto a 1dpo), no es hasta los 7dpo cuando se observa el máximo aumento de concentración.



B. Cambios significativos en la concentración de S1P

Especie	Días post operación				
		Ctrl	1dpo	3dpo	7dpo
S1P $\chi^2_{(4)}=10.933$ $p=0.02732$	1dpo	0.384	-	-	-
	3dpo	0.163	0.049*	-	-
	7dpo	0.006*	0.003*	0.047*	-
	21dpo	0.073	0.027*	0.524	0.082

Figura R1.6. Concentración de S1P en médula espinal a diferentes tiempos tras la LME. A) La figura muestra la concentración de S1P así como los cambios significativos identificados en función del test post-hoc de Conover. B) La tabla detalla los valores obtenidos para S1P según el test post-hoc de Conover. La probabilidad ajustada según la corrección de Benjamini & Hochberg (1995) se expresa según: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$ y se muestra en detalle en la tabla adjunta. El valor χ^2 en la tabla corresponde al estadístico resultante del test no paramétrico de Kruskal-Wallis. El símbolo * en la tabla indica una $pBH<0,05$.

Para examinar la distribución celular y tisular de la S1P en la médula espinal y sus cambios tras la LME, realizamos un estudio inmunohistoquímico comparando médulas sin lesionar y tras 7 post-LME (Figura R1.7). Además, realizamos los controles de anticuerpo secundario para garantizar un marcaje específico del anticuerpo utilizado para la detección de S1P. Los resultados obtenidos demuestran que la S1P presenta un claro marcaje fibrilar, principalmente radial, en la sustancia blanca de la médula espinal control. Este marcaje es similar al marcaje de los procesos de astrocitos, posibilidad que se confirma en IHQ con doble marcaje combinando S1P con el marcador de astrocitos, GFAP (Figura R1.7.A). El marcaje en la sustancia gris es difuso, uniforme y menos intenso, sin evidencias que permitan asociarlo a ningún tipo celular. En las médulas estudiadas a 7 días post-LME, el marcaje de S1P aumenta y se puede apreciar un ligero marcaje en algunas células que podrían corresponder a microglía (Figura R1.7.C y D).

¹⁰**Modelo de rectas paralelas:** el valor de la pendiente de ajuste está restringido. El modelo obliga a ajustar los datos de 1 y 7dpo, de manera independiente, según la pendiente de la recta obtenida en el ajuste del grupo sin lesión medular.

¹¹**Modelo de rectas independiente:** permite el ajuste de los datos a una línea recta calculando la pendiente óptima. En este caso, al contrario que al emplear rectas paralelas, el modelo no limita el valor de la pendiente de la recta.

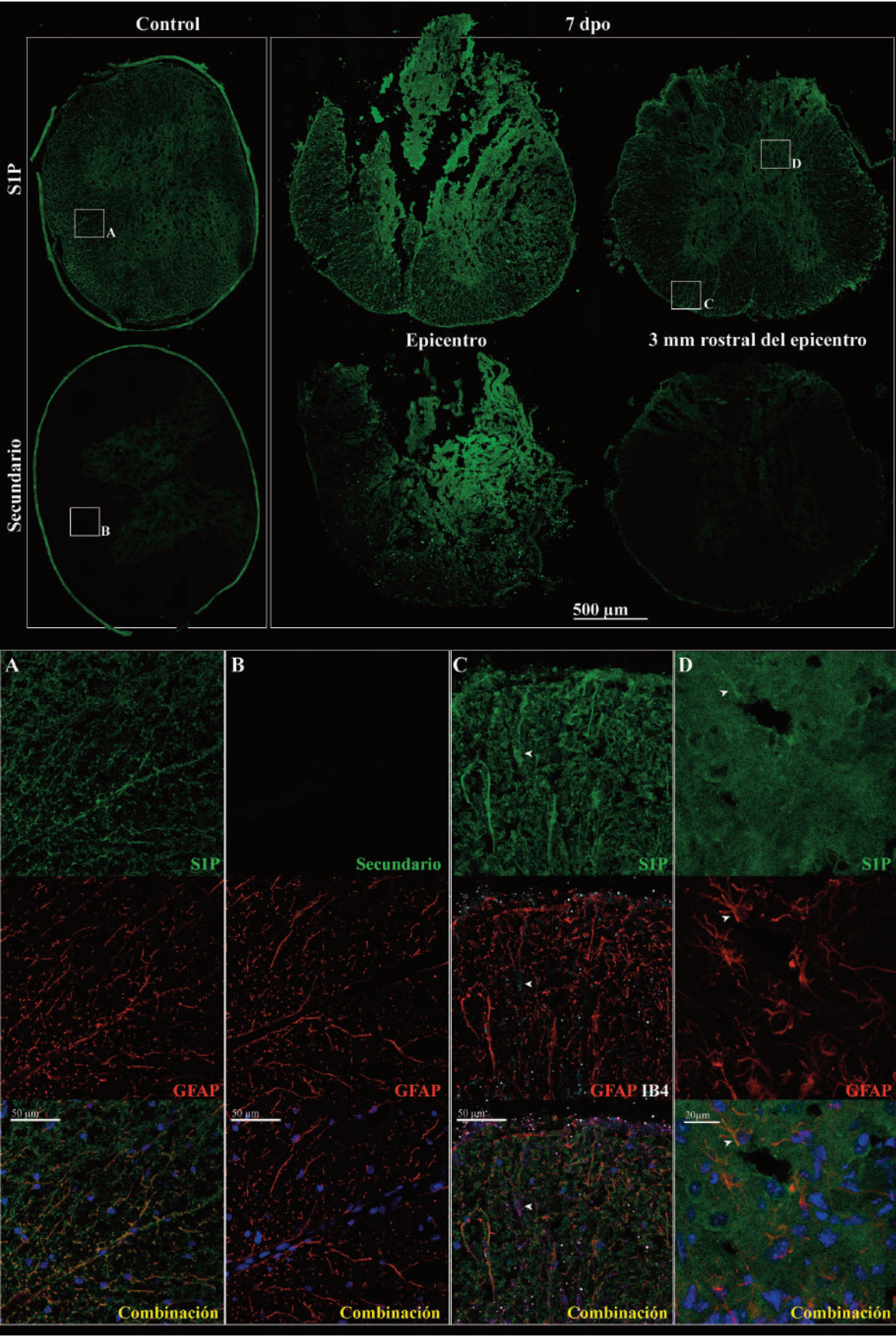


Figura R1.7. Inmunohistoquímica contra S1P en médula espinal. Las imágenes de microscopía confocal muestran el marcaje de S1P en la médula espinal antes de una lesión medular y los cambios que se observan en S1P a 7dpo en ratones. Las imágenes de la parte inferior (A, B, C y D) muestran los detalles señalados en las imágenes de la parte superior. La falta de marcaje en las tinciones sin anticuerpo primario (señaladas como “secundario” en la figura) descarta que la tinción sea debida al anticuerpo secundario y demuestra la especificidad del marcaje de S1P. GFAP = “glial fibrillary acidic protein”, usada para el marcaje de astrocitos; IB4 = isolectina B4, usada para el marcaje de microglía y vasos sanguíneos; Combinación = superposición de las imágenes de tinción de la respectiva sección (A-D).

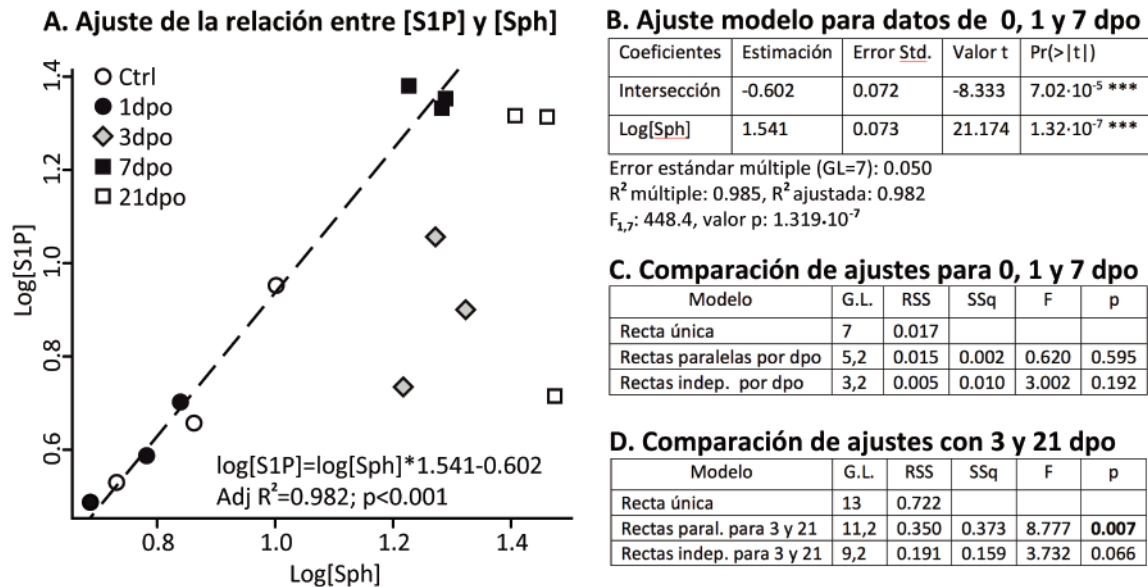
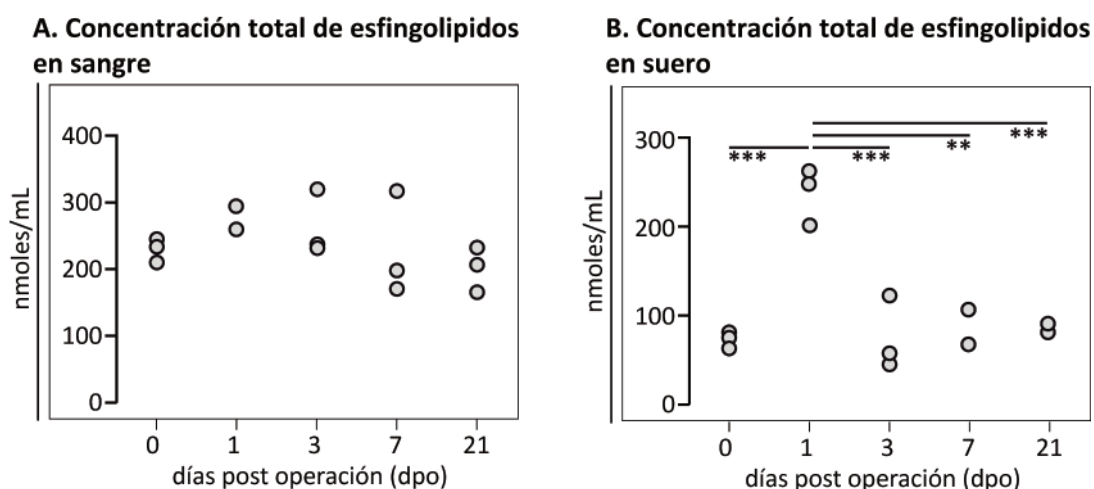


Figura R1.8. Relación entre Sph y S1P. A) Gráfico bivariente comparando los logaritmos de las concentraciones de Sph y de S1P. La gráfica muestra la estrecha relación ($R^2_{adj}=0.982$) entre ambas especies en individuos control (ausencia de lesión) y tras 1 y 7dpo. B) La tabla muestra los parámetros del ajuste entre las concentraciones de Sph y S1P (expresadas en logaritmos) en muestras de individuos control y tras 1 y 7 tras la lesión. C) La tabla muestra la comparación del ajuste de los modelos para control, 1dpo y 7dpo. D) La tabla muestra la comparación del ajuste de los modelos para el total de grupos. G.L.=grados de libertad; RSS=suma de los residuos al cuadrado; SSq=suma de cuadrados; F=estadístico F de Snedecor; p=probabilidad.

Considerando las relaciones observadas entre las concentraciones de especies metabólicamente relacionadas, decidimos evaluar la relación entre la concentración de S1P y su precursor no fosforilado, Sph. Al incluir todas las muestras de médula espinal, las concentraciones de Sph y S1P muestran una baja relación ($R^2_{adj}=0.284$; $F_{(1,13)}=6.564$; $p=0.024$). Sin embargo, cuando analizamos los datos de las muestras provenientes de individuos control, 1 y 7dpo observamos una íntima relación entre la concentración de ambas especies. La relación observada entre estos grupos es particularmente estrecha cuando se ajusta un modelo exponencial ($[S1P]=[Sph]^{3/2}/4$; $R^2_{ajustada}=0.982$, $F_{(1,7)}=448.4$, $p<0.001$; Figura R1.8), sin mejoras significativas al ajustar rectas paralelas¹⁰ ($\text{Log}(S1P)\sim\text{Log}(Sph)+\text{dpo}$; $p>0.5$; ver Figura R1.8.C) o incluso rectas independientes¹¹ para cada tiempo ($\text{Log}(S1P)\sim\text{Log}(Sph)*\text{dpo}$; $p>0.1$; ver Figura R1.8.C). Por el contrario, los datos de los individuos muestreados a 3 y 21dpo no se ajustan a la recta establecida con los controles y los individuos muestreados a 1 y 7dpo. El modelo mejora de forma significativa cuando los datos de 3 y 21 días post-lesión se ajustan a sus propias rectas paralelas ($p=0.007$; Figura R1.8.D), pero no mejora de manera significativa al ajustar rectas con pendientes diferentes ($p=0.066$; Figura R1.8.D).

En resumen, los análisis realizados revelan que la concentración de S1P está directa e íntimamente relacionada con la concentración de su precursor, Sph, en los controles y que esta relación se mantiene a 1 y 7 días post-operación, pero se pierde significativamente a 3 y 21dpo. Estos resultados sugieren que la concentración de S1P en la médula sin lesionar así como a 1 y 7dpo depende casi exclusivamente de la concentración de Sph. Sin embargo, en los días post-operación en los que se pierde esta estrecha relación, observamos que la concentración de S1P es marcadamente inferior a la que correspondería a concentraciones equivalentes de Sph en condiciones control y a 1 y 7dpo. Esto parece indicar que otros factores pueden estar alterando la relación S1P/Sph, disminuyendo la concentración relativa de S1P con respecto a los niveles correspondientes de esfingosina.



C. Cambios significativos en la concentración total de esfingolípidos en suero tras LME

Tejido	Días post operación				
		Ctrl	1dpo	3dpo	7dpo
Suero $F_{(4)}=21.21$ $p<0.001$	1dpo	<0.001*	-	-	-
	3dpo	1	<0.001*	-	-
	7dpo	1	0.002*	1	-
	21dpo	1	<0.001*	1	1

Figura R1.9. Concentración total de esfingolípidos en sangre y suero a diferentes días post-LME. La figura muestra la concentración total de esfingolípidos (nmol/mL) que presentan los distintos individuos analizados en función de los días post-LME en sangre (A) y suero (B). La probabilidad de que los cambios sean significativos según la corrección de Benjamini & Hochberg (1995) se expresa según: (**) $p<0,01$ y (***) $p<0,001$ y se muestra en detalle en la tabla adjunta. C) La tabla muestra la probabilidad ajustada (con corrección de Bonferroni) de que los cambios observados en suero a distintos días post-operación sean significativos. El valor "F" en la tabla corresponde al estadístico resultante del test post-hoc de Tukey. El símbolo (*) en la tabla indica una $p(BH)<0,05$ para facilitar la visualización de los datos.

CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS EN SANGRE Y SUERO

Al igual que en el caso médula espinal, evaluamos si la concentración total de esfingolípidos en estos tejidos permanece constante o si, por el contrario, varía en los diferentes días post-LME estudiados. Los datos de sangre (Sup.Mat. 1.B, pág. 280) muestran ligeras variaciones en la concentración total de esfingolípidos, con una tendencia hacia el aumento paulatino hasta un máximo entre 1 y 3dpo y una posterior disminución a 7 y 21dpo hasta niveles similares a los observados en ausencia de lesión

(Figura R1.9). Sin embargo, el análisis mediante ANOVA de una vía demuestra que las variaciones observadas no son estadísticamente significativas ($F_{(4,9)}=1.016$, $p=0,448$).

Por su parte, la concentración total de esfingolípidos en las muestras de suero (Sup.Mat. 1.C, pág. 281) experimenta un cambio marcado a 1dpo (Figura R1.9), con valores que prácticamente triplican los observados en los demás grupos. Los resultados del análisis estadístico mediante el test ANOVA confirman el efecto de la lesión sobre la concentración total de esfingolípidos ($F_{(4,9)}=21,21$, $p<0,001$). El test post-hoc de Tukey, indica que la concentración total de esfingolípidos observada a 1dpo es significativamente mayor que la observada en los demás tiempos analizados ($p<0,01$ respecto a 7dpo y $p<0,001$ respecto al resto de tiempos).

Tejido	Especie	$F_{(4, 10)}$	p	pBH
Sangre	SM14:0	14,174	0,000	0,015
	Cer24:1	9,986	0,002	0,015
	dhCer22:0	10,988	0,001	0,015
	GluCer16:0	12,306	0,001	0,015
	GluCer18:0	11,220	0,001	0,015
	GluCer20:0	9,986	0,002	0,015
	Cer14:0	8,918	0,002	0,020
	dhCer20:0	8,304	0,003	0,022
	Cer18:1	7,886	0,004	0,024
	SM18:1	6,810	0,007	0,036
	SM14:1	6,601	0,007	0,037
Suero	GluCer20:0	29,742	0,000	0,001
	SM16:0	15,711	0,000	0,004
	dhSM16:0	17,438	0,000	0,004
	GluCer16:0	15,200	0,000	0,004
	GluCer22:0	12,306	0,001	0,007
	GluCerTotal	11,774	0,001	0,007
	GluCer22:1	10,819	0,001	0,009
	dhCer16:0	9,986	0,002	0,010
	GluCer18:0	9,747	0,002	0,010
	dhSMTTotal	7,988	0,004	0,017
	dhCer22:0	7,988	0,004	0,017
	GluCer24:0	7,754	0,004	0,018
	Cer20:0	7,500	0,005	0,019
	SM18:0	7,259	0,005	0,019
	SM24:0	6,918	0,006	0,021
	Cer16:0	5,666	0,012	0,039
	dhCer24:0	5,223	0,016	0,048
	dhSM18:0	5,063	0,017	0,050

Tabla R1.8. Especies con cambios significativos de concentración en sangre y suero tras una LME. La tabla detalla los esfingolípidos que presentan cambios significativos de concentración (p ajustada o $pBH<0,05$).

F = estadístico de Fischer; p = probabilidad sin correcciones; pBH = probabilidad ajustada tras aplicar la corrección de Benjamini & Hochberg (1995).

Adicionalmente, analizamos los cambios de concentración en las distintas especies de esfingolípidos. Al igual que ocurre en médula espinal, la mayoría de datos de las especies analizadas en sangre y suero no cumplen los requisitos de normalidad y homocedasticidad de los test ANOVA (datos no mostrados). Por tanto, llevamos a cabo el análisis estadístico utilizando el test de Kruskal-Wallis con el factor de corrección de múltiples comparaciones FDR (Benjamini y Hochberg, 1995) para el cálculo de la probabilidad (p) asociada a cada análisis. Las especies que presentan cambios significativos de concentración tras la LME se muestran en la Tabla R1.8.

Como se aprecia en la tabla, los análisis identificaron un total de once especies que cambian significativamente su concentración en sangre tras la LME. Las especies con cambios incluyen a miembros de las familias de las ceramidas, dihidroceramidas, esfingomielinas y tres especies de glucosil/galactosil ceramidas (GluCer16:0, GluCer18:0 y GluCer20:0). A diferencia de la médula espinal, no existe predominio de un sustituyente en particular entre las esfingolípidos con cambios de concentración. Tampoco se observan cambios en los metabolitos más simples (Sph o S1P) ni en ninguna especie de lactosilceramidas o dihidroesfingomielinas. Del total de especies con cambios, únicamente la Cer24:1 se encuentra entre las especies con una concentración mayoritaria en este tejido, de acuerdo con los datos previamente descritos.

En el caso de suero, identificamos 18 especies con variaciones significativas de concentración tras la LME, un número claramente superior al registrado para muestras de médula espinal o sangre. Los cambios de concentración se registran en especies de todas las familias con residuos grasos excepto las lactosilceramidas. Al igual que en médula, se producen más cambios de concentración en las especies con residuo de ácido palmítico (C16:0). A diferencia de sangre y médula espinal, se observan cambios significativos en múltiples especies mayoritarias (SM16:0, dhSM16:0, dhCer24:0 y GluCer24:0), así como en el total de la concentración de dhSM y GluCer. En el caso de familia de las dhSM, la especie dhSM16:0 representa aproximadamente el 74% de la contribución al total, por lo que es esperable que las variaciones en su concentración resulten, a su vez, en cambios de la concentración del total de esta familia. En el caso de las GluCer, la segunda familia de esfingolípidos más abundante en suero, seis de las ocho especies estudiadas (que suponen más del 55% del total de la familia) presentan variaciones significativas que, como en el caso de las dhSM, redundan en el cambio significativo en la concentración total de esta familia tras la LME.

Al comparar las especies con cambios significativos en su concentración tras la lesión medular, observamos que no existe ninguna coincidencia entre las especies identificadas en muestras de médula espinal y sangre. Sin embargo, los cambios en suero y sangre coindican en tres especies de la familia GluCer (GluCer16:0, GluCer18:0 y GluCer20:0) y la especie dhCer22:0. Las muestras de suero también presentan coincidencias con respecto a médula espinal en las especies SM16:0, SM24:0, dhSM16:0, Cer16:0 y dhCer16:0.

Tabla R1.9. Evaluación de las especies cambiantes en suero. La columna Tasa L1/Ctrl muestra el ratio, por encima de cinco, entre la concentración observada a 1dpo (L1) y en ausencia de lesión (Ctrl). La columna de la derecha, ilustra el promedio de la concentración de las especies seleccionadas en los distintos tejidos en individuos control. Las especies señaladas en gris corresponden a las especies que cumplen los criterios planteados para su consideración como potenciales biomarcadores. La especie GluCer22:1 no fue detectada en muestras de sangre.

Especie	Tasa L1/Ctrl	Promedio en Controles (pmol/mg ó pmol/mL)		
	Suero	Médula	Sangre	Suero
dhSM16:0	6,9	1,4	1706,1	537,6
dhSM18:0	46,0	27,0	510,3	39,9
dhSMTtotal	8,9	118,0	9637,1	727,8
GluCer16:0	6,7	11,7	201,1	197,1
GluCer18:0	13,5	160,3	13,9	41,9
GluCer20:0	6,3	52,0	6,8	40,9
GluCer22:1	7,1	77,6	-	19,2
SM18:0	8,4	244,7	8651,5	1896,0

¿SON LA GLUCER22:1 O LA GLUCER18:0 POTENCIALES BIOMARCADORES DE LME?

El estudio de muestras de suero, además de permitir caracterizar la concentración de esfingolípidos tras la lesión medular, posibilita la identificación de especies que puedan servir de biomarcadores diagnósticos tempranos de la lesión medular. Para este fin, seleccionamos especies con cambios de concentración marcados en las muestras tomadas a 24 horas post-lesión, definiendo como límite de inclusión aquellas especies que presentasen un aumento medio de concentración mínimo de 5 veces respecto a la concentración de la especie en ausencia de lesión medular. Las especies que cumplen ese filtro se recogen en la Tabla R1.9. Posteriormente, incorporamos un criterio de especificidad basado en la selección de especies con altas concentraciones en médula espinal y niveles bajos en sangre y suero.

Como se muestra en la Tabla R1.9, dos especies de Glucosil/Galactosil Ceramidas (GluCer18:0 y GluCer22:1) cumplen los criterios planteados. La especie GluCer18:0 es la segunda con un aumento más drástico a un día post lesión en suero. Además, es la cuarta especie más abundante en médula espinal y presenta una concentración en sangre y suero muy baja. Por su parte, la especie GluCer22:1 también cumple los criterios planteados aunque su concentración en suero no experimenta un aumento tan elevado y sus niveles basales en médula espinal son menores.

DISCUSIÓN

El estudio de la fisiopatología de una enfermedad permite identificar potenciales dianas sobre las que desarrollar estrategias terapéuticas, establecer la ventana espacio-temporal óptima de actuación y determinar marcadores que proporcionen información relevante sobre la historia natural de dicha patología. En ese sentido, este primer apartado de la tesis está destinado a identificar alteraciones en la concentración de los esfingolípidos de la médula espinal que puedan participar en la fisiopatología de la LME.

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Nuestro análisis lipidómico demuestra que tanto la médula espinal como la sangre y el suero presentan perfiles de esfingolípidos (porcentajes relativos de las distintas familias de esfingolípidos) característicos que, en general, se mantienen inalterados tras la LME (Figura R1.1). Los tres tipos de muestras presentan características comunes, como la abundancia de esfingomielinas y de especies N-aciladas con ácidos grasos de cadena muy larga (C24:0 y C24:1). La abundancia relativa de SM es superior al 50 % del total de esfingolípidos en las muestras de médula espinal y por encima del 80% en sangre y suero. Estas observaciones son coherentes con estudios previos que demuestran que las esfingomielinas son la familia más abundante tanto en células de mamífero, donde forman parte constitutiva de las membranas celulares (Gault *et al.* 2010), como en el plasma, asociadas a lipoproteínas como VLDL (*very low density lipoprotein*) y LDL (*low density lipoprotein*) (Hammad *et al.* 2010). Por su parte, la abundancia de especies sustituidas con ácidos grasos C24:0 y C24:1 en las diferentes familias de esfingolípidos representa también una característica común observada previamente tanto en muestras murinas de pulmón, músculo y suero (Gosejacob *et al.* 2016) como en muestras humanas de plasma (Hammad *et al.* 2010), cerebro y médula espinal (Brien & Rouser 1960; Svennerholm & Stallberg-Stenhagen 1968).

A pesar de estas similitudes, el perfil de la médula espinal presenta diversas características propias que difieren de sangre y suero, especialmente la elevada proporción de cerebrósidos (Glucosil y Galactosil Ceramidas; GluCer). Los cerebrósidos son los principales esfingolípidos glicosustituídos del cerebro (hasta un 5% del peso seco de la materia gris y un 16% de la materia blanca según Johnson *et al.*, 1949, siendo necesarios para el correcto funcionamiento de neuronas y oligodendrocitos durante el desarrollo del SNC (Gault *et al.* 2010). La diferente proporción de cerebrósidos supone también una de las mayores diferencias observadas entre los perfiles de sangre y suero, siendo su concentración menor al 1,1% en sangre y superior al 2% en suero (con un valor máximo del 6,3%).

Otra característica propia de la médula espinal es la abundancia de especies N-aciladas con ácido esteárico (C18:0). La abundancia de especies con sustituyentes C18:0 ha sido descrita en distintas familias de esfingolípidos en muestras humanas de cerebro (Zhao *et al.* 2015; Laviad *et al.* 2008) y médula espinal (Svennerholm & Stallberg-Stenhagen 1968). Según Laviad y colaboradores (Laviad *et al.*, 2008), el cerebro presenta altos niveles de expresión de Ceramida Sintasa 1 (CerS1) que incorpora específicamente ácido esteárico a las bases esfingoides para formar ceramidas y dihidroceramidas C18:0. Esta enzima podría ser responsable de la abundancia de esfingolípidos basados en ceramida C18:0 en células neurales (Venkataraman *et al.* 2002). De hecho, la CerS1 también presenta una alta expresión en músculo (Laviad *et al.* 2008) coincidiendo con una alta concentración de esfingomielinas y ceramidas C18:0 (Gosejacob *et al.* 2016).

Contrariamente al predominio de las formas C18:0 en la médula espinal, los perfiles de sangre y suero se caracterizan por la abundancia de especies palmitoil-N-aciladas (C16:0) en las familias de SM, dhSM y LacCer y de la especie sustituida con ácido behénico o docosanoico (C22:0) entre las ceramidas. De forma coherente, se han observado concentraciones elevadas de Cer22:0, SM16:0 y LacCer16:0 en suero de origen murino y en plasma humano (Gosejacob *et al.* 2016; Hammad *et al.* 2010). En los perfiles de sangre y suero también resulta destacable que, a excepción de las

esfingomielinas, las demás familias presentan una concentración menor del 5%. En este sentido, es interesante destacar que en el estudio de Hammand *et al.*, (2010) (Hammad *et al.* 2010) la familia de las lactosíceramidas supone la segunda especie mayoritaria en suero y plasma humano (aprox. 5.8%), mientras que en nuestros análisis, esta familia es claramente minoritaria ($\leq 0,05\%$ del total). Esta disparidad podría deberse a diferencias en la concentración de LacCer dependientes del origen de las muestras (murino y humano). De hecho, resultados preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio con muestras de plasma humano muestran porcentajes de LacCer cercanos al 1% (datos no mostrados), claramente superiores a los observados en las muestras de ratones aunque sin alcanzar los valores descritos por Hammand *et al.* (2010). Las disparidades también podrían responder a diferencias en el procesado de las muestras, desde los procedimientos de extracción de lípidos hasta los “spikes” empleados para la normalización de los datos o la sensibilidad propia de los equipos de UPLC-MS.

CAMBIOS EN LA MÉDULA ESPINAL

Los resultados del presente estudio sugieren que la lesión medular no altera de forma sustancial los perfiles de los tres tipos de muestras ni la concentración total de esfingolípidos en la médula espinal. Sin embargo, el análisis detallado de las concentraciones de las especies individuales de esfingolípidos en la médula espinal revela cambios significativos en varias especies. Estos cambios se pueden dividir en tres grupos que incluyen especies con perfiles similares tras la lesión medular y que además están relacionadas metabólicamente.

1. **Cambios en especies N-aciladas.** El primer grupo está compuesto fundamentalmente por especies C16 de diferentes familias (N-aciladas con ácido palmítico (C16:0) o ácido palmitoleico (C16:1)), que muestran un aumento significativo de concentración a los 3 días post-operación. La elevada correlación entre las concentraciones de las especies de este grupo sugiere que la actividad de las enzimas implicadas en la ruta metabólica de los esfingolípidos se preserva tras la lesión permitiendo la interconversión entre estas especies (ver Figura R1.4).

Identificar las causas de los cambios en estas especies, como en otros análisis similares en muestras heterogéneas (Wang *et al.* 2006) resulta complicado por la combinación de cambios de las poblaciones celulares (entrada de células inmunes, muerte de células neurales) y posibles cambios en la ruta metabólica que alteren la concentración de esfingolípidos en las propias células. La abundancia de especies C16:0 en las muestras de sangre y suero parece apoyar la posibilidad de que el aumento de estas especies en la médula espinal esté causado por la entrada de componentes sanguíneos, incluyendo células inmunes. De hecho, Cuzzocrea y colaboradores (2009) detectan inmunoreactividad contra ceramida únicamente tras la LME y restringida fundamentalmente a “células inflamatorias” de la sustancia gris y blanca. No obstante, la ruptura de la barrera hematoencefálica y la extravasación de componentes sanguíneos son máximas en las primeras 24 horas tras la lesión (Noble & Wrathall 1989; Hausmann 2003) y no coincide con el máximo de concentración de especies C16 observado a 3dpo. Por el contrario, sí coincide con el período de entrada de monocitos (Profyris *et al.* 2004) y con la máxima activación de macrófagos/microglía (Sroga *et al.* 2003). Si esta fuese la causa subyacente,

y considerando que el máximo de infiltración y actividad se mantiene hasta los 7dpo, cabría esperar que la concentración de especies C16 se mantuviese prácticamente constante. Sin embargo, nuestros resultados muestran una disminución de concentración a 7dpo que no respaldaría esta posibilidad. El aumento de especies C16:0 también podría relacionarse con alteraciones en la alimentación inducidas por el trauma. En humanos bajo condiciones de ayuno se ha observado que la concentración de SM16:0 y Cer16:0, dos de las especies que aumentan significativamente en médula espinal tras la LME, aumentan significativamente en plasma y suero (Hammad *et al.* 2010). Una cierta privación de nutrientes puede ocurrir durante los primeros días tras la LME reflejada en la pérdida de peso en los animales lesionados. De hecho, la pérdida de peso observada a 1dpo coincide con un aumento de la concentración de Cer16:0 y SM16:0 en las muestras de suero (Sup.Mat. 4.C; Pág. 287). Sin embargo, no concuerda temporalmente con el aumento de estas especies en médula espinal, que ocurre a 3dpo coincidiendo con el inicio de la recuperación del peso de los animales en nuestros experimentos.

Alternativamente, este aumento de las especies C16 podría estar causado por cambios intracelulares en la ruta metabólica de los esfingolípidos. Las Ceramida Sintetas 5 y 6 (CerS5 y CerS6) son las principales enzimas responsables de la síntesis de especies palmitoil-N-aciladas y suponen aproximadamente el 25% de la expresión del total de ceramidas sintetas en cerebro según los estudios de Laviad y colaboradores (2008). Sin embargo, pese a la elevada expresión de CerS5 y CerS6, las especies C16:0 no son mayoritarias en la médula espinal intacta, quizás reguladas por la disponibilidad de ácido palmítico. En este sentido, estudios previos han demostrado que la concentración de algunos ácidos grasos aumenta en cuestión de segundos tras eventos característicos de la lesión medular como la isquemia o la hipoxia, si bien el principal aumento de concentración no implica al ácido palmítico sino a los ácidos grasos del tipo C18:0, C20:4 y C22:6 (Horrocks & Harder 1983). Por tanto, con la información disponible no es posible establecer el origen de los cambios en este grupo de esfingolípidos, lo que limita las posibilidades para inferir sus consecuencias fisiológicas. A esto se añade la falta de información detallada acerca de las funciones específicas de muchas especies individuales de esfingolípidos. No obstante, pueden proponerse algunas implicaciones para los cambios de concentración en determinadas especies, como en el caso de la Cer16:0, capaz de inducir apoptosis en diferentes tipos celulares (Osawa *et al.* 2005; Seumois *et al.* 2007; Aflaki *et al.* 2012). Coherentemente, Cuzzocrea y colaboradores (2009) observaron que el bloqueo de la síntesis de ceramida, tanto a través la síntesis *de novo* como por la degradación de esfingomielinas, reduce la muerte celular, la infiltración de neurotrófilos, el estrés oxidativo y la producción de citoquinas pro-inflamatorias promoviendo una mayor preservación tisular y una mejor recuperación funcional. Sin embargo, la contribución del aumento de Cer16 a los 3dpo a los procesos de inflamación y muerte celular es probablemente menor, habida cuenta los reducidos niveles de estas especies dentro del conjunto de ceramidas presentes en la médula espinal. Es más, estudios recientes demuestran que la Cer16:0 también actúa como citoprotector en cultivos celulares y posiblemente en algunos procesos cancerígenos, reduciendo el estrés oxidativo y la apoptosis (Senkal *et al.* 2010).

Dentro de las especies N-aciladas con cambios tras la LME, también se encuentran la LacCer16:0 y la LacCer24:0 (el único esfingolípido con un cambio de concentración significativo en la médula espinal que contiene un ácido graso de más de 16 carbonos). A diferencia de lo que ocurre en el caso de la Cer16:0, las Lactosil Ceramidas 16:0 y 24:0 sí suponen una cantidad apreciable de la concentración total de esta familia (alrededor del 25%). Según demuestran los estudios de Pannu *et al.* (2004 y 2005), las Lactosil Ceramidas tienen una importante contribución a la fisiopatología de los traumas del sistema nervioso central mediando en la reactividad astrogial inducida por TNFalfa (ver también (Mayo *et al.* 2015)) y promoviendo el estrés oxidativo a través de la sobreexpresión de la enzima óxido nitrato sintasa inducible (iNOS) (Pannu *et al.* 2004). Como consecuencia, el bloqueo de la síntesis de Lactosil Ceramidas atenúa la gliosis y el daño secundario inducido por la inflamación, mejorando la recuperación funcional en modelos murinos (Pannu *et al.* 2005). Estas evidencias sugieren que el aumento de LacCer16:0 y LacCer24:0 podría contribuir a la fisiopatología de la lesión medular, aunque existen discrepancias entre los tiempos de activación/inducción de los procesos y el aumento de concentración de las Lactosil Ceramidas. Según la bibliografía, el máximo aumento de la expresión de TNFalfa (inductor de la síntesis de lactosil ceramidas según Pannu *et al.*, 2005) así como de iNOS (inducible por el aumento de concentración de LacCers, Pannu *et al.*, 2004) se produce casi inmediatamente tras la lesión y su expresión se encuentra ya en franco descenso a los 3 dpo (Nakahara *et al.* 2002; Hayashi *et al.* 2000), cuando las Lactosil Ceramidas alcanzan su máxima concentración según nuestros resultados.

2. **Cambios en las bases esfingoides.** El segundo grupo de esfingolípidos con cambios de concentración tras la lesión medular implica a las dos bases esfingoides libres analizadas en este estudio, la esfingosina (Sph) y dihidroesfingosina (dhSph). Las concentraciones de ambos esfingolípidos aumentan progresivamente tras la lesión medular de forma completamente correlacionada ($R^2=0,982$; Figura R1. 8). Una relación similar entre las concentraciones de Sph y dhSph (Sph/dhSph) se ha observado en estudios previos en distintos tejidos y especies (cerdo: hígado= $0,26\pm0,13$; pulmón= $0,32\pm0,04$; riñón= $0,21\pm0,03$ (Riley *et al.* 1993); orina femenina humana= $0,20\pm0,02$ (Qiu & Liu 2001); y médula espinal intacta de ratón= $0,30\pm0,02$ (presente estudio)). De hecho, la relación Sph/dhSph se ha propuesto como biomarcador de la exposición a fumonisinas (micotoxinas que inhiben la actividad de las Ceramida Sintetas). Interesantemente, se ha observado que la concentración de fumonisina B1 necesaria para bloquear la ruta de transformación de dhSph a Sph (y por tanto reducir la correlación entre sus niveles) es 25 veces mayor ($25\mu\text{M}$) en cultivos de neuronas (Merrill *et al.* 1993) que en cultivos de hepatocitos ($1\mu\text{M}$; Wang *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que la relación Sph/dhSph podría ser particularmente estable en el sistema nervioso central, quizás indicativo de una alta regulación de los niveles de estos esfingolípidos en la médula. De hecho, nuestros estudios demuestran que esta relación se mantiene pese a la LME, con unos valores cercanos a los registrados en médula espinal intacta ($0,28\pm0,02$).

La elevada correlación entre estos esfingolípidos resulta particularmente llamativa porque, a pesar de que la conversión de dhSph en Sph sólo requiere la desaturación de la primera, en sistemas biológicos estas especies están conectadas a través de dos familias intermedias (dhCer y Cer) y sujetas a la acción de tres enzimas diferentes (ceramida sintasa (CerS), ceramidasa (CDasa) y desaturasa). La transformación requiere la acilación de la dhSph por CerS para dar lugar a diferentes dihidroceramidas (dhCer) sobre las que actúa la dhCer desaturasa (Des1 o Des2) produciendo ceramidas que, tras la acción de diferentes ceramidases, finalmente, da lugar a la esfingosina. Curiosamente, la relación de las concentraciones de dhSph y Sph con estos intermedios no alcanzan niveles de correlación similares a los observados directamente entre ellas. Así, aunque en ausencia de lesión medular, la concentración total de dhCer sí muestra una alta correlación con la concentración de dhSph ($R^2=0,971$), esta correlación desaparece tras el trauma ($R^2=0,003$ a 1dpo); mientras que ni las concentraciones totales de dhCer y Cer ni las concentraciones totales de Cer y Sph muestran ninguna correlación ni siquiera en ausencia de LME ($R^2=0,097$ y $R^2=0,083$, respectivamente).

La elevada correlación entre los cambios de dhSph y Sph podría deberse a la existencia de un mecanismo regulador de las concentraciones de ambas especies que sirva para equilibrar la síntesis *de novo* y la degradación de los esfingolípidos. De hecho, (Echten *et al.* 1990) mostraron que la esfingosina exógena inhibe la incorporación de serina en la síntesis *de novo*. Es más, estudios detallados han demostrado que la miriocina, un compuesto de estructura homóloga a la esfingosina, bloquea la síntesis *de novo* inhibiendo la actividad de la serina palmitoil transferasa (SPT) (Merrill 2011; Miyake *et al.* 1995). Algo similar podría ocurrir en el caso de las esfingomielinas y dihidroesfingomielinas cuyas concentraciones muestran una alta correlación ($R^2>0,9$ para el total de las familias y mayor de 0,8 en especies individuales; datos no mostrados) a pesar de que su transformación también ocurre a través de las familias dhCer y Cer que, como ya hemos mencionado, no muestran correlaciones comparables.

Resulta tentador pensar que las elevadas correlaciones encontradas entre dhSph/Sph y dhSM/SM podrían ser fruto de la actividad de enzimas que posibiliten la interconversión directa entre las especies afectadas. De hecho, Michel *et al.* (Michel *et al.* 1997) observaron *in vitro* que la dhSM puede servir como sustrato de la enzima dihidroceramida desaturasa, aunque esta conexión no ha sido demostrada *in vivo*. En general, los estudios realizados hasta la fecha parecen descartar las transformaciones directas mencionadas, aunque faltan análisis específicos que lo demuestren de forma concluyente. Por ejemplo, Scheider *et al.* (Schneider & Kennedy 1968) observaron que el marcaje de dhSM tritlada disminuía en la secuencia dhSM>dhCer>dhSph sugiriendo que su catabolismo se produce en este orden. Sin embargo, en este estudio no se analizaron los esfingolípidos insaturados (SM, Cer, ...) y, por tanto, no se puede rechazar una posible transformación de dhSM en SM. Lagunas similares se pueden observar en el análisis de la relación entre dhSph y Sph. Así, el estudio de Ong y Brady (Ong & Brady 1973) descarta la transformación directa de dhSph en Sph debido a la ausencia de Sph marcada tras añadir dhSph marcada isotópicamente. Sin embargo, y a pesar de que los propios autores sugieren que la pérdida

de Sph libre marcada podría deberse a su baja concentración o a su rápida acilación, este estudio ha servido desde entonces como referencia para descartar la posible interconversión entre estas bases esfingoides.

3. **Cambios en la esfingosina-1-fosfato.** El tercer grupo de especies con un patrón propio de cambios significativos tras la LME incluye únicamente a la esfingosina-1-fosfato (S1P). Según los análisis de lipidómica, la concentración de S1P muestra un aumento significativo a 7dpo, hecho que coincide con los resultados de Kimura *et al.* (2007). En este mismo estudio, también observaron que S1P está presente principalmente en neuronas en la médula espinal intacta y que su distribución varía tras la lesión medular, volviéndose claramente presente en astrocitos, y en menor grado en microglía. Sin embargo, nuestros resultados muestran una tinción de S1P predominante en astrocitos antes y, más marcadamente, después de la LME y únicamente una tinción marginal en neuronas y microglía (Figura R1.7).

La esfingosina-1-fosfato es una de las especies mejor caracterizadas en la ruta metabólica de los esfingolípidos ya que supone el único punto de degradación de estos lípidos y además juega un papel fundamental en múltiples vías de señalización. En el sistema nervioso central favorece la supervivencia de oligodendrocitos (Jaillard *et al.* 2005) y neuronas (Mizugishi *et al.* 2005), la neurogénesis (Mizugishi *et al.* 2005), la proliferación de neuroblastos (Harada *et al.* 2004) y la migración de células madre neurales (Kimura *et al.* 2007). También actúa en procesos de mielinización, en la determinación del fenotipo de macrófagos, siendo capaz de cambiar el fenotipo pro-inflamatorios (M1) a anti-inflamatorios (M2) (Hughes *et al.* 2008) o en el mantenimiento y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Prager *et al.* 2015), entre otras muchas funciones. Muchos de estos procesos contribuyen a eventos clave que tienen lugar en la fisiopatología de la LME, sugiriendo que la S1P puede tener potencial terapéutico en el tratamiento de la LME. De hecho, estudios previos demuestran que la administración de FTY720, un análogo estructural y funcional de S1P, redundaba en una mayor recuperación funcional asociada a la modulación del tráfico de células inmunes (Lee *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2009) así como a la reducción de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la astrogliosis (Norimatsu *et al.* 2012).

Entre los eventos que tienen lugar en la fisiopatología de la LME la muerte celular juega un papel fundamental en los déficits funcionales de la LME. Estudios previos han demostrado la importancia del balance entre la actividad protectora y proliferativa de S1P y la actividad pro-apoptótica de otros esfingolípidos como la ceramida y la esfingosina. Este equilibrio es conocido como “el reóstato de esfingolípidos” y ha demostrado ser fundamental en el destino celular (Spiegel 1999). En este sentido, nuestros estudios demuestran que el equilibrio entre la concentración de S1P y su precursor, la Sph, se pierde a 3 y 21dpo a favor de condiciones pro-apoptóticas. Alteraciones equivalentes en el balance de esfingolípidos están presentes en la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas. En esclerosis múltiple, se ha observado un incremento de Sph y Cer acompañado de una reducción de S1P en la sustancia blanca afectada y en las placas

escleróticas (Qin *et al.* 2010). El descenso del ratio S1P/Sph también ha sido observado durante el curso de la enfermedad de Alzheimer (Couttas *et al.* 2014), en esclerosis lateral amiotrófica (Cutler *et al.* 2002), en la enfermedad de Parkinson (France-Lanord *et al.* 1997) y en la de Niemann Pick (Goldin *et al.* 1992) así como en demencia asociada a VIH (Haughey *et al.* 2004). Estas observaciones junto con las numerosas evidencias demostrando la regulación del destino celular (*cell fate*) mediante el reóstatos de esfingolípidos, sugieren que el desbalance de estos metabolitos puede jugar un papel importante en los procesos de muerte celular que caracterizan la fase subaguda de la lesión medular.

En conjunto, los resultados de los análisis de lipidómica en las muestras de médula espinal demuestran que la lesión medular no altera la concentración de los esfingolípidos, excepto en un conjunto muy definido de especies, sugiriendo una conservación en la ruta metabólica. Esta conservación se mantendría pese a alteraciones propias de la fisiopatología de la lesión medular (particularmente en las membranas celulares tanto de los axones como de las vainas de mielina) que podrían afectar a la concentración de esfingolípidos mayoritarios, como las esfingomielinas y los cerebrósidos (GluCer) (Jana & Pahan 2010; Podbielska *et al.* 2011). Es más, las concentraciones de casi todas las especies mantienen niveles similares a los de la médula intacta, a pesar del posible aumento de la síntesis *de novo* que sugiere el aumento de dhSph tras la lesión y que únicamente se refleja en el aumento de Sph y la S1P. Este equilibrio metabólico sólo aparece alterado a los 3 días post-lesión, cuando aumentan los niveles de esfingolípidos acilados por ácidos grasos C16 y se pierde la relación de S1P con Sph (y dada la estrecha relación dhSph-Sph, también con dhSph). Sin embargo, aún en este periodo, se observa una elevada correlación entre especies N-aciladas que sugiere que, en general, los procesos metabólicos implicados en estas transformaciones no cambian drásticamente. De hecho, según nuestros resultados, el único cambio importante en las relaciones metabólicas entre especies de esfingolípidos está representado por la pérdida de correlación entre las concentraciones de Sph y S1P que podrían indicar cambios en la síntesis o degradación de esta última especie, favoreciendo la acumulación de sus precursores pro-apoptóticos. Por tanto, la modulación del metabolismo de la S1P representa una potencial estrategia terapéutica neuroprotectora que podría disminuir la muerte celular neural a tiempos tempranos tras el trauma y, con ello, reducir los déficits funcionales de la lesión medular.

CAMBIOS EN SUERO: BIOMARCADORES

Además de la información relativa al sistema de esfingolípidos en la médula espinal, los análisis lipidómicos realizados han puesto de manifiesto un importante aumento de la concentración de varios esfingolípidos en suero 1 día tras la lesión medular. El interés de esta observación radica en la posible utilidad de estos cambios como biomarcadores tempranos de la lesión medular. Los biomarcadores son características definidas que se miden como indicadores de procesos biológicos normales, patológicos o como respuestas a tratamientos, intervenciones, etc. Según la bibliografía y las agencias como la FDA (*Food and Drugs Administration*), la utilidad de una molécula como biomarcador depende de la posibilidad de identificar sus cambios de forma fiable, cuantitativa y

objetiva, de su especificidad para la patología en análisis y de que la obtención de muestras para su análisis sea accesible y con el mínimo de molestias para el paciente (Mayeux 2004; de Gramont *et al.* 2015). Las muestras de suero suponen una fuente óptima para el análisis de biomarcadores, ya que únicamente requieren una extracción de sangre que se realiza de manera ambulatoria y son almacenadas de forma rutinaria. En este sentido, los cambios observados en los cerebrósidos GluCer 22:1 y, sobre todo, en GluCer18:0 son particularmente interesantes tanto por la magnitud del cambio de concentración (superior a 7 veces los valores de los controles) como por la elevada concentración de ambos cerebrósidos en la médula espinal y su escasa concentración en sangre y suero. De hecho, los cerebrósidos y más concretamente las Galactosil Ceramidas son particularmente abundantes en el sistema nervioso central, siendo componentes mayoritarios de la mielina (ver por ejemplo, Baumann & Pham-Dinh 2001). Por tanto, es probable que el aumento de la concentración de estos cerebrósidos observado en el suero a 1 día tras la lesión se deba a la liberación de estos esfingolípidos desde la médula espinal hacia el torrente sanguíneo como consecuencia directa del trauma y, por tanto, que dependa estrechamente de la severidad del mismo. Esta relación abriría la posibilidad de que la concentración de estos cerebrósidos en suero pueda servir como un nuevo biomarcador diagnóstico de la severidad de la lesión. Además, teniendo en cuenta la estrecha relación entre la severidad de la lesión y los déficits neurológicos resultantes, también podrían ser útiles como biomarcadores pronósticos, aportando información fundamental sobre el estado y las posibles consecuencias del trauma inicial. Sin embargo, los resultados presentes sólo permiten plantear esta hipótesis y sería necesario ampliar los análisis considerando distintas severidades del trauma y otros factores, como la edad o el sexo de los animales, para establecer la sensibilidad y especificidad de estos cambios y confirmar la utilidad de estos cerebrósidos como biomarcadores.

CAPÍTULO II

Caracterización de la esfingosina-1-fosfato liasa tras la lesión medular

INTRODUCCIÓN

El primer apartado de esta tesis ha permitido demostrar que la LME provoca cambios significativos en la concentración de determinados esfingolípidos de la médula espinal. Entre ellos se encuentra la esfingosina-1-fosfato (S1P), una de las especies de esfingolípidos más conocidas debido a sus numerosas funciones biológicas, por ejemplo en migración, proliferación y supervivencia celular (ver Introducción). Este primer apartado también ha permitido determinar que, tanto en ausencia de LME como a diferentes días post-operación, existe una estrecha relación entre la concentración de S1P y la de su precursor (Sph) en la médula espinal. Esta relación, sin embargo, se pierde a 3dpo debido a una reducción de la concentración de S1P con respecto a la concentración de Sph, para recuperarse nuevamente a 7dpo. Estos resultados sugieren que el metabolismo de la S1P podría verse alterado tras la LME. En este sentido es interesante destacar que la S1P puede ser degradada de manera irreversible, a diferencia del resto de esfingolípidos que se encuentran en equilibrio reversible con sus precursores y sus productos (ver Figura I.7). La esfingosina-1-fosfato liasa (SPL) es la enzima responsable de la degradación irreversible de la S1P y supone el único punto de degradación de la ruta de los esfingolípidos (Hannun & Obeid 2008). Así pues, además de la participación de otras enzimas en la transformación reversible de S1P, las variaciones en la expresión o actividad de la enzima SPL podrían resultar determinantes en la concentración de S1P tras la LME. El objetivo de este segundo apartado es proporcionar una visión general de los cambios que se producen en las enzimas responsables del metabolismo de S1P en la médula espinal lesionada, caracterizando en detalle las variaciones de la esfingosina-1-fosfato liasa.

Para alcanzar este objetivo, en primer lugar analizamos muestras de médula espinal murina mediante la técnica de Monitorización de Múltiples Reacciones (*Multiple Reaction Monitoring*; MRM) basada en el análisis mediante UPLC-MS/MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*) para estimar la concentración de:

- i. las enzimas esfingosina-1-fosfato quinasas (SphK1 y SphK2) que sintetizan S1P mediante la fosforilación de la Sph;
- ii. las esfingosina-1-fosfato fosfohidrolasas (SPP1 y SPP2) que degradan S1P reversiblemente por defosforilación y su reconversión a Sph; y
- iii. la enzima SPL que, como ya hemos mencionado, degrada S1P de manera irreversible, dando lugar a la formación de trans-2-hexadecenal y fosfoetanolamina.

Aprovechando que este tipo de análisis permite la determinación simultánea de numerosas proteínas y para completar esta visión global con el estado de la vía de señalización extrínseca de S1P, decidimos analizar también la expresión de los cinco receptores de membrana a través de los que S1P ejerce su acción extracelular (S1PR₁₋₅). Como ya comentamos en el apartado anterior de esta tesis, la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) tras la LME y la consiguiente entrada de suero y células sanguíneas sirven como vehículo de componentes exógenos a la médula espinal, pudiendo alterar la concentración de las moléculas en estudio (lípidos, proteínas...). Para valorar esta posibilidad, decidimos analizar las concentraciones de hemoglobina y albúmina, como indicadores de la entrada de células sanguíneas y suero, respectivamente (Winkler *et al.* 2014; Hsu *et al.* 1985). Las muestras de médula espinal analizadas proceden de ratones hembra de la cepa C57BL/6J,

separados en un grupo de individuos sin lesionar (control) y 3 grupos de individuos lesionados, muestreados a 1, 3 y 7 días tras la lesión (dpo)¹². En este estudio, utilizamos un diseño experimental aleatorizado con una n=2 individuos/grupo (dpo), a excepción del grupo de 7dpo, con n=3.

En segundo lugar, caracterizamos en detalle los cambios de SPL tras la LME. Para ello, decidimos confirmar los resultados de la expresión de SPL obtenidos por MRM mediante la técnica de referencia *western blot*. Además, evaluamos la actividad de SPL mediante un ensayo específico y analizamos la expresión del ARN mensajero (ARNm) del gen *Sgpl1*, codificante para la proteína SPL, mediante qRT-PCR (*Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Para estos estudios, analizamos muestras de médula espinal de grupos experimentales equivalentes a los detallados en el estudio mediante MRM, empleando un diseño experimental por bloques con tres replicaciones (bloques), cada uno con un individuo por grupo (n=1 individuo/dpo), de acuerdo con las propuestas metodológicas de Festing (Festing 2014).

RESULTADOS

ANÁLISIS GLOBAL DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO Y LA SEÑALIZACIÓN DE S1P

Analizamos simultáneamente las 13 proteínas seleccionadas empleando el método de MRM. Para ello, en primer lugar, seleccionamos para cada proteína los péptidos trípticos proteotípicos y las transiciones con mejores condiciones de detección en base a herramientas bioinformáticas (ver Figura M.10 y Figura M.11). En promedio, para cada proteína en estudio, analizamos dos péptidos con tres transiciones cada uno. Toda la información relacionada con la puesta a punto del análisis mediante MRM se encuentra detallada en el correspondiente apartado de materiales y métodos.

Los análisis bioinformáticos nos permitieron determinar un total de 69 transiciones viables para la identificación de las proteínas en estudio. Además de los péptidos propios de las proteínas en análisis, decidimos incorporar una concentración conocida de un péptido AQUA™ análogo al péptido “AGYPLEKPFDFR” de la SPL pero con un aminoácido marcado isotópicamente (10 Daltons más pesado) para cuantificar la expresión de la proteína SPL. Posteriormente, procedimos a establecer los parámetros óptimos de adquisición de datos de las 72 transiciones seleccionadas (incluyendo las tres transiciones del péptido AQUA™; ver Tabla M.9) así como a validar la co-elución de las distintas transiciones de un mismo péptido, empleando una muestra de médula espinal murina sin lesionar. Una vez establecidos los parámetros, llevamos a cabo los análisis de expresión de las proteínas en extractos de médula espinal de ratones control y lesionados muestreados a 1, 3 y 7 días post-operación, realizando tres replicaciones técnicas para cada muestra. Los datos obtenidos, incluyendo información adicional sobre la masa/carga, el tiempo de retención y el área de los picos de cada transición, se recogen en detalle en la tabla correspondiente del material suplementario (Sup.Mat. 5; pág. 288).

Control de calidad y preparación de los datos para su análisis

En primer lugar, realizamos un control de calidad basado en la relación señal/ruido para garantizar que los datos obtenidos reflejan específicamente la concentración del analito evaluado y no son meros artefactos. Complementamos este análisis con los tres controles de calidad propuestos por Chung y sus colaboradores (Chung *et al.* 2014), basados en el tiempo de retención de los analitos y

¹²**Días post-lesión:** el modelo de lesión medular por contusión empleado en el presente estudio se realiza previa cirugía (operación) por ello, se utilizará la nomenclatura “días post-operación (dpo)” como sinónimo de días post-lesión.

la inconsistencia entre los perfiles observados para las distintas transiciones y muestras analizadas. Toda información referente a los controles de calidad aplicados—incluyendo una breve explicación de los mismos y el procedimiento completo necesario para su realización— se encuentra detallada en el correspondiente apartado de materiales y métodos. Las alusiones a esta información serán omitidas en la exposición de los controles de calidad empleados en el presente apartado para facilitar la lectura de los mismos.

Control de calidad (I): relación señal /ruido. Analizamos la relación señal/ruido (S/R) en las tres replicaciones técnicas de los animales sin lesión medular. Adicionalmente, incluimos una réplica de una muestra de 1dpo, para evaluar si los cambios en la composición de la muestra (la matriz) tras la LME podrían afectar a la detección de los analitos. La tabla (Sup.Mat. 6; Pág. 290) muestra las relaciones S/R obtenidas en las diferentes transiciones. Empleamos los datos obtenidos para identificar las transiciones fiables de acuerdo con los siguientes criterios:

1. **Relación $S/R \geq 3$ (Límite de detección (LOD)) para las réplicas:** La relación S/R de la transición debe ser mayor o igual a 3 ($S/R \geq 3$) al menos en dos de las tres replicaciones técnicas del individuo.
2. **Relación $S/R \geq 3$ en animales control.** La mediana de la relación S/R de la transición debe ser mayor o igual a 3 en los dos individuos control analizados. La única excepción a esta regla se detalla en el siguiente criterio.
3. **Relación $S/R < 3$ en animales control pero $S/R \geq 10$ (Límite de cuantificación (LOQ)) a 1dpo.** Ante la posibilidad que el índice S/R muestre valores bajos en los individuos control no debido a una baja sensibilidad de la transición sino a causa de una baja concentración de la proteína en estudio exclusiva de estos controles, analizamos adicionalmente un individuo lesionado seleccionado al azar. En base a este análisis adicional, decidimos que: si la relación S/R de un péptido es inferior a 3 en muestras control pero esta relación a 1dpo es mayor o igual a 10, esta transición no será eliminada debido a que la expresión de la proteína podría aumentar tras la LME.
4. **Transiciones representativas.** Un péptido debe conservar un mínimo de dos transiciones detectables (LOD). En caso de mantener únicamente una transición con una relación $S/R \geq 3$, este péptido será eliminado.

A continuación, se describen brevemente las decisiones tomadas en función de los distintos criterios:

- **Criterios 1 y 2:** eliminamos 19 transiciones al ser consideradas como no detectables (N.D.). Durante este análisis observamos que las transiciones eliminadas para el péptido AQUA™ y su análogo endógeno “AGYPLEKPFDFR” no fueron las mismas. Así, en el péptido marcado isotópicamente, la transición “y4” presenta una relación $S/R < 3$, mientras que presenta valores de $S/R > 3$ en la proteína SPL endógena. Por el contrario, la transición “y5” muestra una $S/R < 3$ en el péptido nativo y claramente superior a 3 en el péptido marcado.
- **Criterio 3:** de las 19 transiciones eliminadas en base al criterio 1, y considerando el tercer criterio establecido, decidimos reincorporar la información de las transiciones “b2” e “y7” del péptido “ITEAHSGASTTDSLPR” del receptor S1PR₄.

- **Criterio 4:** excluimos las medidas del péptido “C[CAM]LPPTLDR” del receptor S1PR₅ y el péptido “YNDLGEQHFK” de la albúmina ya que están determinados a partir de la información de una única transición fiable.

En conjunto, de las 72 transiciones analizadas inicialmente, procedimos a excluir la información de 19. Por tanto, los estudios realizados de aquí en adelante se basan en la información obtenida a partir de las 53 transiciones que cumplen satisfactoriamente con los criterios descritos.

Control de calidad (II): tiempos de retención. Analizamos los coeficientes de variación (C.V.) de los tiempos de retención obtenidos durante el análisis de MRM para identificar transiciones que presenten anomalías. De acuerdo con los criterios planteados por Chung *et al.* (2014), decidimos eliminar aquellas transiciones que presenten un coeficiente de variación en los tiempos de retención de las diferentes muestras y replicas superior al 5% una vez ajustados los valores para eliminar errores sistemáticos (C.V.adj>5%). Como se aprecia en la tabla del material suplementario (Sup. Mat. 7; Pág. 291) donde se detallan los valores para las 53 transiciones consideradas, el análisis no reportó ninguna variabilidad anómala en los tiempos de retención de las transiciones evaluadas.

Control de calidad (III): transiciones inconsistentes. Empleamos el método RMA (*Robust Multichip Analysis*) para calcular la contribución (peso) de cada transición a la estimación de la abundancia del péptido en cada muestra. Esta metodología permite identificar transiciones de un mismo péptido con valores inconsistentes. En la tabla (Sup.Mat. 7; Pág. 291) se muestran la mediana y el rango intercuartílico (IQR) de los pesos para cada transición. Según los criterios propuestos por Chung *et al.* (2014) consideramos inconsistentes, y por tanto eliminables, aquellas muestras que presenten una mediana de pesos < 0,9 o un IQR > 0,4. De acuerdo con este criterio, la transición “y4” del péptido “ETLDMQETTSR” del receptor S1PR₂ es la única transición reconocida como inconsistente ya que, a pesar de presentar una mediana de pesos superior a 0,9, su IQR es mayor de 0,4. Por tanto, decidimos excluir esta transición en futuros análisis.

Control de calidad (IV): muestras inconsistentes. En este caso, empleamos el método RMA para evaluar la contribución (peso) de cada replicación e identificar inconsistencias entre los análisis replicados de una misma muestra. De acuerdo con Chung *et al.* (2014), decidimos excluir aquellas replicas que presenten una mediana de los pesos con valores superiores a 1,05 o menores de 0,95 (diferencia superior al 5%). En base a este criterio, ninguna de las replicaciones analizadas fue considerada anómala como se aprecia en la tabla (Sup.Mat. 8; Pág. 292).

Aparte de los controles de calidad, decidimos evaluar en detalle el péptido AQUA™ (“AGYPLEKPFDFR”) para descartar diferencias en su comportamiento con respecto al péptido análogo endógeno. Sorprendentemente, ambos péptidos presentan distintos tiempos de retención pese a presentar una secuencia de aminoácidos idéntica. Además, el análisis de la relación S/R permitió determinar que las transiciones consideradas como válidas difieren entre ambos péptidos. En base a estos resultados, y asumiendo que el péptido AQUA™ presenta algún tipo de anomalía indeterminada, decidimos excluir este péptido de cualquier análisis futuro.

En resumen, y basándonos en los resultados anteriormente mencionados, decidimos excluir 20 de las 72 transiciones analizadas por no cumplir con los criterios establecidos en los controles de calidad para ser consideradas mediciones fiables. Además, eliminamos la información relativa al péptido AQUA™ al presentar incoherencias en su comportamiento con respecto al péptido endógeno.

Tras aplicar los controles de calidad, normalizamos los datos utilizando la beta-tubulina, una proteína constitutiva (*housekeeping*) ampliamente utilizada en técnicas como *western blot* ya que su expresión se mantiene prácticamente constante tras la LME (Liu & Xu 2006). Dado que con los datos obtenidos del ensayo de MRM la expresión de esta proteína está representada por cuatro transiciones relativas a dos péptidos, decidimos evaluar distintas medidas de centralidad (mediana, media aritmética y media geométrica) para obtener un único valor representativo de su expresión contra el que poder normalizar los datos. Como se observa en la Figura R2.1, las diferencias entre los valores estimados utilizando las medidas de centralidad propuestas son mínimas y, en todos los casos, se mantiene la misma tendencia entre muestras. Por tanto, y de acuerdo con el criterio propuesto por Chung *et al.* (2014), decidimos utilizar la mediana de las cuatro transiciones como estimador de la expresión de la proteína beta-tubulina en la normalización de los datos de las distintas proteínas.

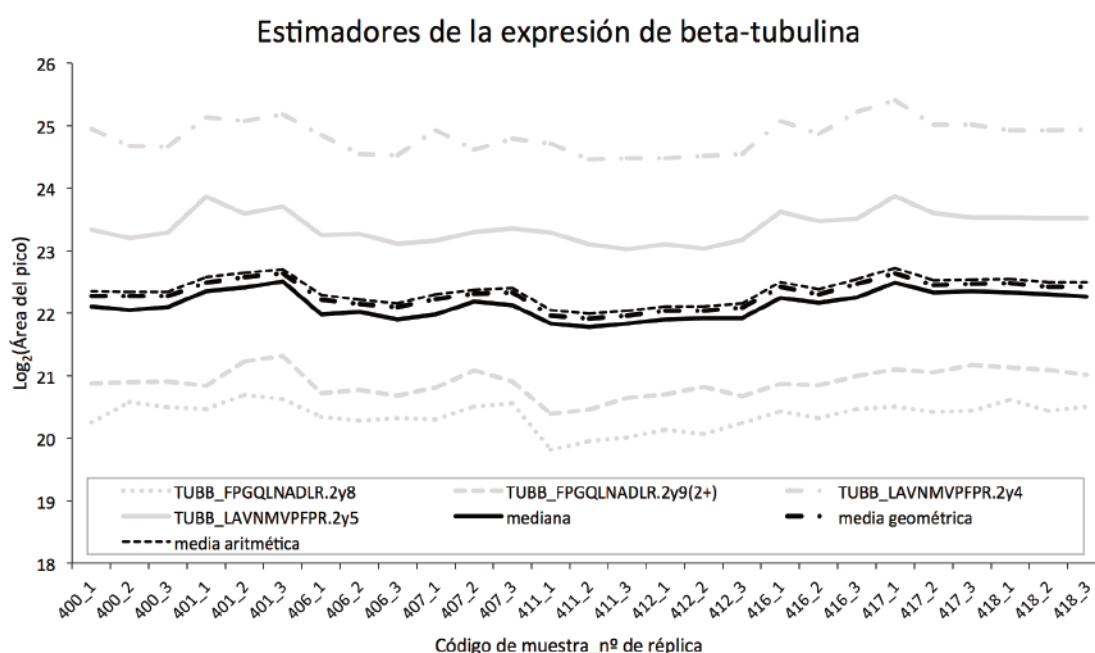


Figura R2.1. Comparación de las medidas de centralidad en la estimación de la expresión de beta-tubulina. La figura muestra el perfil de las transiciones de la proteína beta-tubulina en las distintas muestras analizadas, así como su mediana, media geométrica y media aritmética.

Una vez normalizados los datos, en cada muestra estimamos el valor de cada transición como la mediana de sus 3 replicaciones técnicas. Además, para evaluar los posibles cambios de expresión tras la LME, decidimos establecer un único valor representativo para cada péptido considerando como estimador la media aritmética de sus transiciones. Los valores de expresión estimados para los péptidos analizados en cada muestra se recogen en la Tabla R2.1.

Proteínas y péptidos	Log ₂ (área del pico) (UU.AA)							
	Ctrl		1dpo		3dpo		7dpo	
	#400	#401	#406	#407	#411	#412	#416	#417
SPL1_AGYPLEKPFDFR	14.593	13.977	16.983	16.471	16.367	16.928	15.294	14.841
SPL1_TLPAQGMGTAEVLER	12.077	11.885	12.681	12.309	13.327	13.326	13.763	12.553
SphK1_GLLPRPC[CAM]R	14.710	14.857	14.417	14.596	15.157	14.982	15.397	15.360
SphK2_LSYLPATTEPALPIPGHSLPR	11.961	11.380	11.517	11.251	11.542	11.474	11.685	10.971
SphK2_GVPLSGDQEITPELLPR	15.087	14.657	14.085	14.168	13.997	14.098	15.122	14.805
SPP1_ITIPLAC[CAM]K	14.330	13.998	13.980	13.857	14.057	13.645	13.689	13.247
SPP2_WPRPSFPPVVR	16.561	16.582	16.390	16.447	16.658	15.663	16.008	15.528
S1PR1_YITMLK	13.214	13.545	12.927	13.123	13.193	13.764	13.447	13.230
S1PR1_LTPAQWFLR	14.755	14.406	14.792	14.903	14.636	14.663	14.400	13.972
S1PR2_ETLDMQETTSR	16.317	17.134	17.007	14.526	15.966	16.876	16.708	17.404
S1PR2_EGSAFITLSASFLLAIAIER	14.537	14.090	17.783	16.667	17.537	17.702	15.061	13.546
S1PR3_LVC[CAM]GC[CAM]LVK	14.970	14.836	14.525	14.815	14.638	14.841	14.718	14.555
S1PR3_EHYDYVGK	14.497	13.861	14.943	14.355	14.977	14.709	14.856	14.503
S1PR4_TFQLSPVHWFLR	16.173	15.418	17.593	17.009	17.619	17.769	16.374	14.949
S1PR4_ITEAHSGASTDSSSLRPR	15.050	14.476	18.490	17.704	19.044	18.300	16.300	15.570
S1PR5_LSPALWFAR	14.862	14.877	14.838	14.887	15.071	15.008	14.820	14.774
HBA_TYFPHFDVSHGSAQVK	16.500	15.974	20.834	19.702	20.951	20.406	18.292	16.577
HBB_LHVDPENFR	17.552	16.933	20.338	19.273	19.844	19.595	17.549	16.020
ALBU_APQVSTPTLVEAAR	20.577	20.184	23.247	22.839	22.708	23.249	21.598	20.941
TUBB_FPGQLNADLR	20.771	20.634	20.723	20.740	20.597	20.687	20.603	20.580
TUBB_LAVNMVFPFR	24.077	24.099	24.109	24.088	24.170	24.064	24.238	24.146

Tabla R2.1. Expresión de las proteínas en estudio según el análisis mediante MRM. La tabla recoge las áreas normalizadas de los picos cromatográficos, expresadas como log₂(área del pico).

Análisis de los cambios de expresión

En primer lugar, es necesario destacar que debido a la baja relación señal/ruido en muchas transiciones, los valores de expresión de un gran número de péptidos se basan en datos de transiciones que están dentro de los límites de detección ($S/R \geq 3$) pero no de cuantificación ($S/R \geq 10$). Por tanto, los resultados obtenidos en el presente análisis aportan, de manera cualitativa, una visión general de los potenciales cambios que sufren diversas proteínas implicadas en la vía de S1P tras la LME.

En la Figura R2.2 se ilustran las variaciones de expresión de las proteínas analizadas a diferentes tiempos post-operación. En base a la función de las proteínas seleccionadas observamos lo siguiente:

Enzimas implicadas en la síntesis y degradación de S1P. Según los resultados obtenidos, las quinasas SphK1 y SphK2 (Figura R2.2.C y E), encargadas de la síntesis de S1P, presentan únicamente ligeros cambios de expresión tras la LME pero con perfiles diferentes. En el caso de la SphK1, representada por un único péptido, se puede observar una ligera disminución de su expresión a 1dpo seguida de un aumento progresivo hasta 7dpo. En el caso de la SphK2, los dos péptidos analizados se comportan de manera inconsistente; mientras que el péptido “LSYLPATTEPALPIPGHSLPR” parece indicar que la SphK2 mantiene una expresión constante, el péptido “GVPLSGDQEITPELLPR” sugiere un ligero descenso a 1 y 3dpo. Por su parte, las fosfatasa SPP1 y SPP2 (Figura R2.2.D), encargadas de la degradación reversible de la S1P, se comportan de manera análoga. Si bien es cierto que ambas proteínas conservan un único péptido representativo, los resultados parecen indicar que no se producen grandes cambios de la expresión de estas enzimas a consecuencia de la LME. Finalmente,

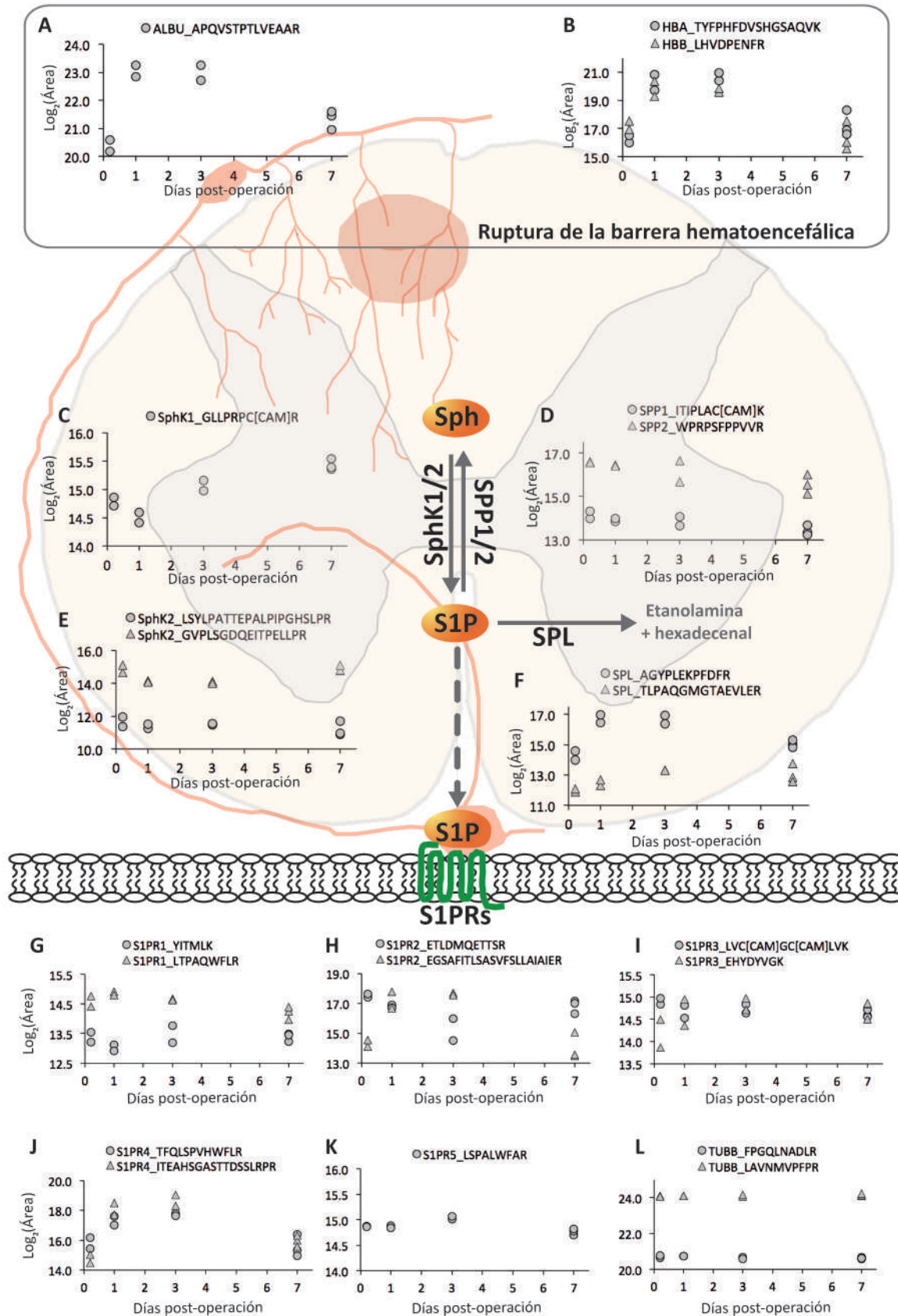


Figura R2.2. Cambios de expresión proteica tras la LME. La gráfica muestra las variaciones observadas tras la LME en la expresión de los péptidos seleccionados para cada proteína. ALBU= albúmina; HBA y HBB= hemoglobina; TUBB= beta-tubulina.

los dos péptidos representativos de la enzima SPL, encargada de la degradación irreversible de S1P (Figura R2.2.F), describen diferentes patrones de variación tras la LME. El péptido “AGYPLEKPFDFR” muestra una clara tendencia al aumento a 1dpo, manteniendo elevada su expresión a 3 dpo y recuperando niveles de expresión similares a los observados en ausencia de lesión medular a los 7dpo. Por el contrario, el péptido “TLPAQGMGTAEVLER” parece indicar que la proteína alcanza su máximo de expresión a 3dpo. La disparidad entre las variaciones observadas en ambos péptidos no permite establecer fehacientemente los cambios de expresión de SPL tras la LME. Sin embargo, ambos péptidos sugieren un aumento de expresión de SPL en los primeros días tras la lesión, seguido de un descenso hasta valores similares a los controles a 7dpo.

Receptores de S1P. La mayoría de estas proteínas presentan incongruencias en las variaciones entre sus péptidos. Este hecho es especialmente notable en el caso del receptor S1PR₁ (Figura R2.2.G), cuyos péptidos se comportan prácticamente de manera especular. Aunque menos destacable, este comportamiento también ocurre en los receptores S1PR₂ y S1PR₃ (Figura R2.2.H e I), imposibilitando establecer un patrón de cambio tras la LME. Por el contrario, los dos péptidos del receptor S1PR₄ (Figura R2.2.J) sí se comportan de manera análoga, mostrando claramente un aumento de expresión hasta 3dpo seguido de una recuperación de los niveles de expresión similares a los observados en ausencia de lesión medular a 7dpo. En el caso del receptor S1PR₅ (Figura R2.2.K), que tras los controles de calidad realizados sólo mantiene un péptido representativo, las variaciones observadas podrían considerarse despreciables. En base a ello, y aún a falta de confirmar los resultados, parece que la expresión del receptor S1PR₅ podría mantenerse constante tras la LME.

Albúmina y hemoglobina: indicadores de la ruptura de la barrera hematoencefálica. La hemoglobina y la albúmina presentan un patrón similar tras la LME, caracterizado por un aumento de la expresión a 1dpo que se mantiene a 3dpo (Figura R2.2.A y B). A 7dpo, los valores de expresión disminuyen hasta niveles cercanos a los observados en ausencia de lesión medular. Esta tendencia coincide con la mayor presencia hemorrágica a 1dpo y su progresiva disminución hasta los 7dpo, cuando prácticamente desaparece (Profyris *et al.* 2004). Interesantemente, este patrón coincide con el observado en el caso del receptor S1PR₄ así como para el péptido “AGYPLEKPFDFR” de la proteína SPL, lo que podría indicar que el aumento de la expresión tanto del receptor como de la enzima, en caso de confirmarse esta tendencia, podrían ser debidos a la entrada de componentes exógenos a consecuencia de la ruptura de la barrera hematoencefálica.

LA EXPRESIÓN DE SPL VARÍA EN MÉDULA ESPINAL TRAS LA LME

Los resultados obtenidos mediante el análisis MRM no permitieron establecer, de manera concluyente, un patrón de cambio en la expresión de la proteína SPL tras la LME. Esta falta de coherencia entre el comportamiento de los dos péptidos seleccionados para cada proteína podría deberse a que uno de ellos, o ambos, se comportasen de manera inestable tras su ionización durante el análisis de espectrometría de masas y, por tanto, mostrar variaciones no debidas únicamente a la expresión de la proteína en estudio. Considerando estos factores, decidimos analizar la expresión de SPL mediante *western blot* (WB). Toda la información relativa al procedimiento seguido para el análisis mediante WB se encuentra detallada en el correspondiente apartado de materiales y métodos. Las muestras analizadas en este estudio corresponden a un experimento con 2 individuos/tiempo (excepto 7dpo, n=3) y dos experimentos más representados por n=1

individuos/tiempo. Los datos obtenidos tras la densitometría de los distintos ensayos mediante WB se resumen en la tabla correspondiente del material suplementario (Sup.Mat. 9; Pág. 292). Para facilitar el tratamiento estadístico de los datos y permitir un análisis por bloques equilibrados, en el caso del primer experimento (Exp. I) utilizamos la media de los valores normalizados de los individuos de cada grupo, de modo que todos los experimentos están representados por un único individuo o un valor promedio. En la Tabla R2.2 se resumen los resultados obtenidos tras la normalización de los datos de SPL con respecto a los correspondientes valores de beta-tubulina.

Tratamiento	Expresión de SPL (UU.AA)		
	Exp. I	Exp. II	Exp. III
Ctrl	1,260	0,288	0,218
1dpo	2,744	1,876	2,042
3dpo	2,317	0,735	0,807
7dpo	1,518	0,249	0,381

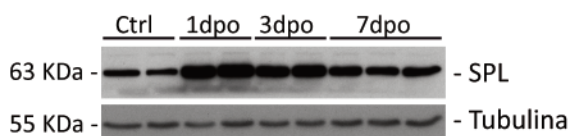
Tabla R2.2. Expresión de SPL tras la LME. La tabla muestra los datos de la densitometría de los WB de SPL. Los resultados están normalizados con respecto a la proteína beta-tubulina. Exp = experimento; Ctrl = control; dpo= días post-operación.

En la Figura R2.3 se muestra, a modo ilustrativo, los resultados obtenidos mediante WB así como una gráfica con los cambios de la enzima SPL tras la LME en los distintos experimentos realizados. En todos los casos, se observa que la expresión de SPL aumenta a 1dpo, disminuyendo progresivamente hasta los 7dpo.

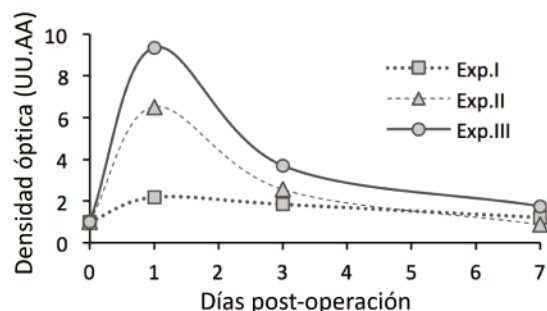
El análisis estadístico de los resultados mediante un test ANOVA permitió comprobar que la expresión de SPL varía significativamente tras la LME. Los resultados obtenidos mediante el test post-hoc de

Tukey (Figura R2.3.C) demuestran que la expresión de SPL a 1dpo es significativamente mayor que en ausencia de lesión y a 7dpo. La expresión de SPL a 1dpo también es significativamente superior que a 3dpo, aunque esta diferencia es menor que con el resto de grupos.

A. Ejemplo de western blot de SPL



B. Expresión proteica de SPL (densitometría)



C. Cambios significativos en la expresión de SPL

Proteína	Días post-operación		
	Ctrl	1dpo	3dpo
SPL	1dpo	<0.001*	-
F _(3,2) =44.26 P<0.001	3dpo	0.027*	0.006*
	7dpo	1	<0.001* 0.067

Figura R2.3. Expresión de SPL tras la LME. A) En la figura se muestran las correspondientes bandas de las proteínas SPL y beta-tubulina obtenidas mediante WB. B) La gráfica muestra la variación de la expresión de SPL tras la LME según la densidad óptica correspondiente a los resultados obtenidos mediante WB. Los datos representados están normalizados con respecto al respectivo grupo sin lesionar. C) La tabla muestra la probabilidad ajustada según el test post-hoc de Tukey (con corrección de Bonferroni) de que los cambios de expresión de SPL observados a distintos días post-lesión sean significativos. El valor "F" en la tabla corresponde al estadístico resultante del test ANOVA. Exp = experimento; Ctrl = control; dpo = días post-operación

LA EXPRESIÓN DE SGPL1 AUMENTA PROGRESIVAMENTE TRAS LA LME

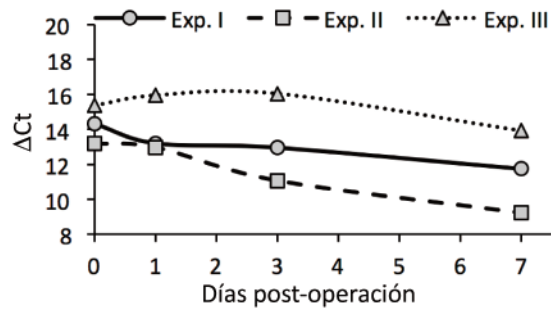
Tras comprobar que la expresión de la proteína SPL varía significativamente tras la LME, evaluamos si esta variación también ocurre a nivel de expresión génica. Para ello, empleamos la técnica de qRT-PCR para analizar la expresión del gen Sgpl1, que codifica la enzima SPL, en individuos control y en individuos muestreados a 1, 3 y 7dpo. Los ciclos umbral (Ct) obtenidos, así como los de la subunidad ribosomal 18S ampliamente utilizada como normalizador en este tipo de ensayos, se muestran en la tabla correspondiente del material suplementario (Mat. Sup. 10; Pág. 293). En la Tabla R2.3 se resumen los valores normalizados ($\Delta Ct = Ct_{Sgpl1} - Ct_{18S}$) obtenidos para la expresión de Sgpl1 tras la LME.

	Exp. I	Exp. II	Exp. III
Ctrl	14,326	13,204	15,369
1dpo	13,202	12,971	15,952
3dpo	12,948	11,066	16,047
7dpo	11,739	9,220	13,925

Tabla R2.3. Expresión de Sgpl1 tras la LME.
En la tabla se muestran los valores umbral de ciclo normalizados (ΔCt) a diferentes días post-operación. Los datos están normalizados con respecto a los Ct de la subunidad 18S del ARN ribosomal. Exp = experimento; Ctrl = control; dpo = días post-operación.

Como se aprecia en la Figura R2.4.A, la expresión de Sgpl1 aumenta progresivamente tras la LME hasta los 7dpo (nótese que a menor valor de ΔCt , mayor cantidad de ARNm). El correspondiente análisis estadístico mediante el test ANOVA y el test post-hoc de Tukey permitió determinar que la expresión del ARNm de Sgpl1 aumenta significativamente a 7dpo con respecto muestras control (Figura R2.4.B). En la misma figura se puede observar que a 1 y 3dpo, la expresión de Sgpl1 varía de forma diferente según el ensayo.

A. Expresión génica de Sgpl1



B. Cambios significativos en la expresión génica de Sgpl1

mRNA	Días post-operación			
		Ctrl	1dpo	3dpo
Sgpl1 $F_{(3,2)}=7.189$ $P=0.021$	1dpo	1	-	-
	3dpo	1	1	-
	7dpo	0.034*	0.054	0.208

Figura R2.4. Expresión de Sgpl1 tras la LME. A) La gráfica muestra las variaciones de la expresión de Sgpl1 a diferentes tiempos tras la LME. B) La tabla muestra la probabilidad ajustada de que los cambios de expresión de Sgpl1 observados a distintos días post-operación sean significativos según el test post-hoc de Tukey (con corrección de Bonferroni). El valor “F” en la tabla corresponde al estadístico resultante del test paramétrico ANOVA. El símbolo (*) indica una $p<0,05$ para facilitar la visualización de datos. Ctrl = control; dpo = días post-operación.

LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SPL TAMBIÉN VARÍA TRAS LA LME

Para completar la caracterización de SPL tras la LME, decidimos evaluar su actividad enzimática utilizando un ensayo fluorogénico específico (ver “Determinación de la actividad enzimática de SPL”, en el apartado de materiales y métodos). Para ello, previamente realizamos la puesta a punto del ensayo optimizando el tiempo de incubación óptimo y la concentración de proteína.

Ensayo de actividad SPL: determinación del tiempo óptimo de incubación

Con el objetivo de minimizar el número de animales de experimentación necesarios, decidimos utilizar la línea celular de neuroblastoma de ratón (Neuro2a; N2a) para determinar el tiempo óptimo de incubación con el sustrato fluorogénico. Para ello, analizamos distintas concentraciones de extracto celular y diferentes tiempos de incubación. Los datos obtenidos se encuentran recogidos en la tabla Sup. Mat. 11 (Pág. 293) del material suplementario y de forma resumida en la Tabla R2.4.

Tiempo (h)	Blanco		1 mg/mL		3,3 mg/mL	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
2,5	655	6,08	743,33	5,86	1040,00	15,10
5	655,33	11,85	1000,67	21,57	1585,00	14,80
10	655,33	9,29	1501,33	35,81	2638,67	12,66
20	937,33	68,72	2586,67	35,12	4910,67	148,11

Tabla R2.4. Determinación del tiempo de incubación óptimo en el ensayo de actividad de SPL. La tabla muestra el valor promedio (\bar{X}) de los triplicados realizados a distinta concentración y tiempo de incubación. Asimismo, se muestra la desviación estándar (SD) de los valores medios obtenidos.

Como se ilustra en la Figura R2.5, la concentración de sustrato fluorogénico procesado y, por tanto, la señal de fluorescencia, aumenta considerablemente con el tiempo, maximizando las diferencias entre las distintas concentraciones sin llegar a alcanzar condiciones saturantes. En vista de estos resultados, decidimos establecer 20h de incubación con el sustrato fluorogénico para todos los ensayos en los que se evalúe la actividad enzimática de SPL.

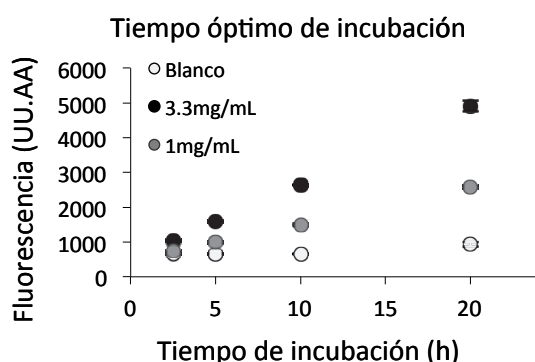


Figura R2.5. Actividad enzimática de SPL en función del tiempo de incubación. La gráfica ilustra la fluorescencia obtenida en función de la concentración de extracto celular de N2a y a diferentes tiempos de incubación con el sustrato fluorogénico. La muestra “blanco” corresponde a muestras sin extracto celular.

Ensayo de actividad SPL: determinación de la concentración óptima de extracto proteico de médula espinal

Una vez establecido el tiempo óptimo de incubación con el sustrato fluorogénico, decidimos analizar la actividad SPL en función de distintas concentraciones de proteína en extractos de médula espinal con el objetivo de optimizar la cantidad de muestra necesaria así como asegurar que, en las condiciones establecidas, el ensayo no alcanza condiciones de saturación. Considerando que la SPL requiere del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP) y que, según el protocolo facilitado por los desarrolladores del método (Bedia *et al.* 2009), es necesario añadirlo al ensayo para garantizar que la ausencia de actividad no es debida a la ausencia de cofactor, decidimos evaluar también si la adición de PLP podría modificar los resultados obtenidos en el ensayo de actividad. Para estos análisis, utilizamos extracto de médula espinal (sin lesionar) de ratones hembra *wild type* (WT) de 12 meses de edad (aprox.), en un rango de concentraciones de 0,125 a 8mg/mL y evaluamos la actividad enzimática de SPL en presencia y ausencia de PLP. Los datos obtenidos en el presente ensayo se encuentran detallados en la tabla Sup.Mat. 12 del material suplementario (Pág. 294) y de forma resumida en la Tabla R2.5.

		Concentración total de proteína en médula espinal (mg/mL)						
	Análisis	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Con PLP	Exp. I	4120	2916	2113,5	1474	997,5	677	435
	Exp. II	-	3549	2661	1726,5	1140,5	738,5	480,5
	Exp. III	4397	3971,5	2879	1949	1240,5	723	399,5
Sin PLP	Exp. I	4246,5	3138,5	2189	1533	1002,5	649	450
	Exp. II	-	3616,5	2690,5	1756	1219,5	724	373,5
	Exp. III	5852	4402,5	3150	2042	1297	786	448

Tabla R2.5. Determinación de la concentración óptima de médula espinal. En la tabla se recogen los datos de actividad de SPL a distintas concentraciones de extracto de médula espinal, en presencia y ausencia de PLP. Los valores mostrados corresponden al promedio de las tres replicaciones técnicas analizadas en cada caso, una vez eliminada la señal inespecífica correspondiente (blanco). Exp = experimento; PLP = piridoxal-5'-fosfato.

La Figura R2.6 ilustra las variaciones de actividad de SPL en función de la concentración de proteína total de médula espinal, en presencia y ausencia del cofactor PLP. La gráfica muestra que la actividad SPL aumenta con respecto a la concentración de proteína total de médula espinal analizada sin alcanzar la saturación en las concentraciones analizadas. En vista de estos resultados y con objeto de minimizar la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo el ensayo de actividad de SPL, decidimos establecer la concentración de 2.5mg/mL de proteína total como la concentración óptima para este ensayo. Para evaluar estadísticamente si las diferencias observadas en la actividad SPL realmente pueden considerarse despreciables al realizar el ensayo en presencia o ausencia del cofactor PLP, empleamos un intervalo de confianza del 95% (IC95%). Para ello, calculamos la tasa resultante de dividir los valores obtenidos con PLP entre los obtenidos sin PLP (Con PLP/Sin PLP) en todos los casos, así como el promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (σ) de los dos ensayos para cada grupo (dpo). Así, haciendo uso de los valores tabulados para el cálculo de un intervalo de confianza del 95% ($z=1,96$), calculamos el rango de confianza de los datos obtenidos según la fórmula: $IC95\% = \bar{X} \pm 1,96\sigma$. Los intervalos calculados se ilustran en la Figura R2.6.B, donde se puede observar que, en todos los casos, estos intervalos oscilan alrededor de la línea discontinua con origen en el valor 1, lo que demuestra que la adición de PLP no condiciona la actividad SPL en las muestras de médula espinal independientemente de la concentración empleada.

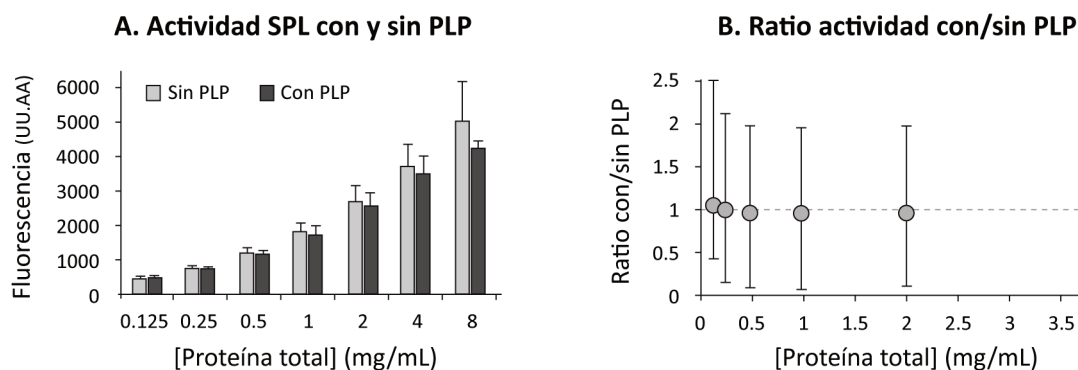


Figura R2.6. Determinación de la concentración óptima de médula espinal. A) La gráfica muestra el valor promedio de la actividad de SPL (medida como fluorescencia; UU.AA) de las muestras de extracto de médula espinal murina analizadas, así como su desviación estándar ($n=3$, a excepción de 8mg/mL con $n=2$). B) Intervalos de confianza al 95% de la tasa entre muestras con y sin PLP a diferentes concentraciones. En este análisis se obviaron los datos relativos a la concentración de 8mg/mL debido a que la falta de valores por triplicado podría comprometer la comparación entre concentraciones. PLP = piridoxal-5'-fosfato.

Análisis de la actividad enzimática de SPL

Una vez establecidos los parámetros óptimos del ensayo procedimos a evaluar la actividad enzimática de SPL tras la LME. Para ello, empleamos muestras de animales control y lesionados muestreados a 1, 3 y 7 dpo procedentes de tres experimentos independientes representados en todos los casos por un individuo por grupo (dpo). Aunque la adición de PLP al ensayo enzimático no afecta a la actividad en el análisis previo de muestras de médula espinal sin lesionar, no podemos asumir que la propia lesión no altere los requerimientos de PLP. Por tanto, en dos de los tres experimentos, replicamos los análisis de actividad con y sin adición de PLP. En la tabla Sup. Mat. 13 del material suplementario (Pág. 294), se muestran detalladamente los resultados obtenidos en el presente estudio.

La exploración de los datos permitió apreciar que en el primer experimento (Exp. I), los valores de la muestra sin extracto proteico (blanco), empleados para estimar la señal inespecífica, resultaron notablemente más elevados que las muestras análogas de los demás experimentos, e incluso, mayores que los datos de muestras con extracto medular. Dada la homogeneidad de los valores de muestras problema con respecto a los valores obtenidos en los demás experimentos, asumimos que los valores del blanco del Exp. I son medidas anómalas. Por tanto, decidimos utilizar como blanco un valor de 700, un promedio aproximado al valor de la muestra “blanco” obtenido en los experimentos II y III. Los valores de actividad obtenidos tras las correcciones incorporadas se resumen en la Tabla R2.6.

		Ctrl	1dpo	3dpo	7dpo
Exp. I	Con PLP	1298,5	950	1253	1461,5
Exp. II	Con PLP	754	1040	1200,5	1309,5
	Sin PLP	638	989,5	1159	1228,5
Exp. III	Con PLP	1211	830,5	889,5	1079,5
	Sin PLP	1148	866	915,5	129

Tabla R2.6. Actividad de SPL a diferentes días post-operación. La tabla muestra el promedio de los valores de fluorescencia obtenidos en el ensayo tras restarle el valor correspondiente al blanco. Exp = experimento; PLP = piridoxal-5'-fosfato; Ctrl = control; dpo = días post-operación.

Para evaluar si realmente la lesión medular condiciona los requerimientos de PLP, analizamos los datos obtenidos en los experimentos II y III en presencia y ausencia de PLP. Como se observa en la Figura R2.7.A, las diferencias entre ambas condiciones son mínimas y no muestran una tendencia coherente entre experimentos. Para confirmar estadísticamente estas observaciones y evaluar si las diferencias observadas realmente pueden considerarse despreciables, empleamos intervalos de confianza del 95% (IC95%), tal y como se explicó en el apartado anterior. Los intervalos calculados oscilan en todos los casos alrededor del valor 1 (Figura R2.7.B), lo que demuestra que la adición de PLP no condiciona la actividad SPL en la médula espinal, ni siquiera tras la LME.

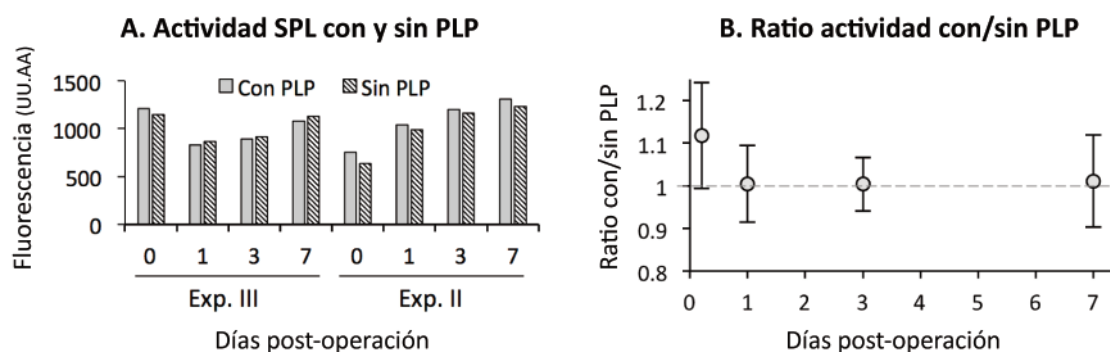
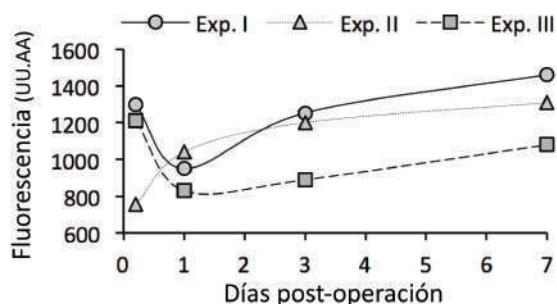


Figura R2.7. Efecto del PLP sobre la actividad SPL tras la LME. A) La gráfica muestra la actividad SPL a diferentes días post-lesión, en presencia y ausencia de PLP. B) Se muestran los intervalos de confianza al 95% de la tasa entre muestras con y sin PLP a diferentes días post-lesión. Exp = experimento; PLP = piridoxal-5'-fosfato.

En vista de estos resultados, decidimos evaluar los posibles cambios de actividad SPL tras la LME manteniendo la adición de PLP al ensayo de actividad. Los datos analizados en este estudio se encuentran recogidos en detalle en la Tabla R2.6 e ilustrados en la Figura R2.8. En esta figura se aprecia claramente que la actividad de SPL disminuye a 1dpo para luego aumentar progresivamente hasta los 7dpo en los experimentos I y III. Sin embargo, el experimento II describe un patrón distinto, caracterizado por un aumento progresivo de la actividad SPL tras la LME. A pesar de ello, los tres experimentos reportan actividades similares tras la lesión, limitando las discrepancias únicamente al grupo control. De hecho, aunque existen diferencias entre los valores de actividad obtenidos en los Exp. I y III para muestras control y los observados durante la determinación de la concentración óptima del ensayo de actividad SPL (Figura R2.5), el conjunto de estas evidencias pone de manifiesto que los valores obtenidos en el Exp. II para muestras sin lesión medular resultan excesivamente bajos. Asumiendo, por tanto, algún tipo de anomalía en esta medida, podemos concluir que, en general, la tendencia descrita para la actividad SPL tras la lesión medular queda claramente reflejada en los Exp. I y III.

El análisis estadístico de los datos utilizando un test ANOVA demuestra que la lesión medular induce cambios significativos en la actividad enzimática de la SPL (Figura R2.8.B). Al aplicar el test post-hoc de Tukey, los resultados demuestran que la actividad SPL aumenta significativamente a 7dpo con respecto a 1dpo. Aunque actividad SPL a 1dpo tiende a diferenciarse de la actividad en ausencia de lesión medular ($p < 0,1$; Figura R2.8.B) es posible que la falta de datos en la muestra control del Exp. II subestime las diferencias observadas en este caso.

A. Actividad SPL tras la LME**B. Cambios significativos en la actividad SPL**

Actividad	Días post-operación			
		Ctrl	1dpo	3dpo
SPL	1dpo	0.057	-	-
$F_{(3,2)}=8,486$ $P=0.021$	3dpo	0.572	0.394	-
	7dpo	1	0.034*	0.428

Figura R2.8. Actividad de SPL tras la LME. A) La figura muestra la actividad de SPL (expresada como unidades arbitrarias de fluorescencia) a diferentes días tras la lesión medular. B) La tabla muestra la probabilidad de que los cambios de actividad de SPL a distintos días post-operación sean significativos según el test post-hoc de Tukey (con corrección de Bonferroni). Para el análisis estadístico no se tuvo en consideración el valor de la muestra control del Exp. II al ser considerado como valor anómalo. El valor "F" en la tabla corresponde al estadístico resultante del test paramétrico ANOVA. El símbolo (*) en la tabla de los resultados del test post-hoc de Tukey indica una $p < 0,05$ señalada para facilitar la visualización de los datos. Exp. = experimento; Ctrl = control; dpo = días post-operación.

DISCUSIÓN

En la práctica clínica, una gran parte de las estrategias empleadas en el tratamiento de enfermedades está enfocada a modular la síntesis, la degradación o la actividad de moléculas específicas. Para desarrollar estas estrategias resulta crucial analizar en detalle posibles dianas, aportando información sobre su contribución a la fisiopatología de la enfermedad y evaluando aproximaciones plausibles para su modulación. En este sentido, el primer apartado de la presente tesis puso de manifiesto la existencia de cambios en la concentración de S1P tras la LME que podrían contribuir de diferentes maneras a los procesos secundarios asociados a la lesión. Este segundo apartado está destinado a aportar una visión general de los cambios que induce el trauma medular en las enzimas implicadas en el metabolismo de S1P, caracterizando en detalle las variaciones de la esfingosina-1-fosfato liasa y valorando el potencial de ésta como diana terapéutica.

Para el análisis general del estado de la ruta metabólica de la S1P y sus vías de señalización extracelular, analizamos 13 proteínas clave empleando la técnica de Monitorización de Reacciones Múltiples. Desafortunadamente, a pesar de la potencialidad de esta técnica (nombrada en 2012 técnica del año por la revista "Nature Methods"; doi: 10.1038/nmeth. 2329), gran parte de los resultados obtenidos son poco concluyentes y no permiten establecer de forma fiable los cambios que experimentan las proteínas en estudio tras la LME.

Estas dificultades se deben en primer lugar a la imposibilidad de realizar cuantificaciones fiables en muchas de las transiciones analizadas. De forma habitual en espectrometría de masas, la señal obtenida (área del pico en el presente estudio) se considera fiable para cuantificar la concentración de un analito si supera en 10 veces los niveles de ruido (Shrivastava & Gupta 2011). Si la relación

señal/ruido presenta valores entre 3 y 10 se considera una evidencia de la presencia del analito aunque insuficiente para cuantificar su abundancia. En este estudio, tan sólo 32 de las 72 transiciones estudiadas presentan una relación señal/ruido consistentemente superior a 10. Dado que aplicar un criterio de exclusión superior al límite de cuantificación hubiese supuesto eliminar la información de 40 transiciones, decidimos establecer un criterio de selección basado en el límite de detección (la mediana de los controles debía tener una relación S/R >3). A pesar de aplicar este criterio menos restrictivo, tuvimos que eliminar los valores de 19 transiciones, limitando de forma importante la información disponible de varios péptidos.

La relación señal/ruido depende de diferentes parámetros y condiciones, pero es particularmente sensible a la resolución del analizador de masas del equipo. En los analizadores de triple cuadrupolo, habitualmente empleados en MRM, la resolución es relativamente baja (Liebler & Zimmerman 2013). Como consecuencia, la presencia de contaminantes con una masa nominal isobárica similar al péptido de interés aumenta y con ella la probabilidad de interferencias y el ruido del análisis (Liebler & Zimmerman 2013). Obviamente, este efecto es clave en proteínas presentes a bajas concentraciones en muestras (matrices) complejas, mientras que en aquellas muy abundantes (*v.g.*: albúmina, hemoglobina o tubulina) el efecto de las interferencias es prácticamente irrelevante ya que la relación señal/ruido se mantiene elevada y permite cuantificaciones fiables.

Es interesante señalar que, a pesar de la importancia de la relación señal/ruido, existe una importante falta de consenso a la hora de medir el nivel de ruido en los análisis de MRM. En varias de las aplicaciones informáticas empleadas en MRM, como el AB Sciex Analyst (*v.* 1.4.5), es el propio investigador quien selecciona arbitrariamente la región en la que medir el ruido. Además, en los programas probados (AB Sciex Analyst, MacCoss Skyline), el ruido sólo se puede medir en una región, a pesar de que el nivel de ruido anterior y posterior a la elución del pico de interés raramente resulta similar. Por este motivo, analizamos el ruido de manera manual de acuerdo con el método propuesto por Zhang y colaboradores (Zhang *et al.* 2011). Este método establece la región donde medir el ruido en función del tiempo de retención del pico de interés y considera ambos laterales del pico de elución, generando una evaluación individualizada para cada transición.

El segundo problema que ha condicionado los resultados del presente estudio es la presencia de importantes disparidades en los cambios de concentración de las proteínas que se infieren según el péptido analizado. De acuerdo con la bibliografía (Picotti & Aebersold 2012; Liebler & Zimmerman 2013), empleamos dos péptidos y tres transiciones por péptido para analizar cada proteína con objeto de aumentar la confianza en la especificidad del ensayo en muestras complejas como la médula espinal. Como ilustran perfectamente los casos de los receptores S1PR₁ y S1PR₂ mostrados en la Figura R2.2, en algunas proteínas los patrones de cambio tras la lesión medular son completamente opuestos según el péptido empleado para estimar su concentración. Diversos estudios han soslayado este problema usando el promedio de los valores de los péptidos como medida de expresión de la proteína (Colangelo *et al.*, 2013). Sin embargo, esta práctica podría dar lugar a estimaciones que no se ajustan a la información obtenida directamente del análisis, como ilustran los datos del receptor S1PR₁ aquí mostrados. En este caso, en el que los péptidos se comportan prácticamente de manera especular, aplicar el promedio resultaría absolutamente improcedente ya que los resultados reportarían que la expresión de este receptor se mantiene constante tras la LME cuando la

información del péptido “LTPAQWFLR” indica una tendencia al aumento de expresión tras la lesión, contraria a la tendencia al descenso señalada por el péptido “YITMLK”.

En determinados casos, las incoherencias entre péptidos de una misma proteína podrían deberse a errores de medida asociados a una baja concentración, aunque también podrían responder a diferencias en la estabilización iónica de los péptidos, que afectarían a su detección y cuantificación. En este sentido, es importante resaltar que tanto el diseño del ensayo (incluyendo la selección de los péptidos y las transiciones a analizar) como la posterior puesta a punto del ensayo juegan un papel clave para reducir la repercusión de los problemas inherentes al método y favorecer la obtención de resultados robustos (Liebler & Zimmerman 2013). En el diseño y puesta a punto del presente estudio empleamos algoritmos predictivos del programa AB Sciex MRM Pilot para seleccionar los péptidos trípticos proteotípicos y sus transiciones. Sin embargo, las predicciones bioinformáticas tienen importantes limitaciones. Así, por ejemplo, no es posible predecir la totalidad de los fragmentos peptídicos resultantes de la digestión tríptica de un extracto de proteínas (Colangelo *et al.* 2013). Esta limitación es particularmente importante cuando se analizan proteínas con *splicings* alternativos o modificaciones post-transcripcionales, o secuencias con sitios de corte perdidos –sitios de corte enzimático que deberían romperse al incubar con tripsina pero que permanecen intactos generando péptidos no considerados en el análisis– (Picotti & Aebersold 2012). En gran medida, las limitaciones de las predicciones bioinformáticas pueden subsanarse mediante la validación empírica en el equipo a emplear de los péptidos y las transiciones en muestras de proteína pura así como en las propias muestras a analizar. Sin embargo, establecer las condiciones óptimas de cada péptido y sus fragmentos, para cada condición y tipo de muestra a evaluar resulta un esfuerzo ímprobo, inabordable en la mayoría de casos.

El diseño de los ensayos se ha simplificado mucho con el reciente desarrollo de bases de datos y librerías de espectros como el SRM Atlas (www.SRMAtlas.org) o la base de datos Proteomics DB (www.proteomicsdb.org), que incorporan evidencias experimentales acerca de los péptidos y las transiciones de numerosas proteínas. Desafortunadamente, estos repositorios ni siquiera se habían empezado a desarrollar en el momento en el que realizamos este estudio. Actualmente, aunque se sigue completando estas bases de datos, la mayor parte de información está referida a *Homo sapiens* con únicamente una parte marginal de información sobre *Mus musculus* u otras especies. En concreto, SRMAtlas tiene cierta cobertura de proteínas de ratón pero la información específica para MRM o SRM es únicamente predictiva, basada en datos empíricos que provienen de analizadores de masa de tipo trampa de iones, orbitrap o tiempo de vuelo. Estos sistemas difieren en las condiciones de adquisición así como en el modo de disociación por colisión con respecto a analizadores de triple cuadrupolo (QqQ) como el empleado para el presente análisis de MRM (Picotti & Aebersold 2012; Liebler & Zimmerman 2013). Es necesario tener en cuenta que las consecuentes diferencias en los patrones de fragmentación y, por tanto, en las abundancias relativas de las transiciones entre estos analizadores de masas podrían derivar en la selección de péptidos inadecuados para el MRM (De Graaf *et al.*, 2011). A pesar de que esta información no estaba disponible cuando realizamos el análisis, resulta interesante mencionar que 24 de los 25 péptidos seleccionados en la puesta a punto de este estudio están incluidos entre los predichos en el SRMAtlas, aunque en algunos de ellos no corresponden a los péptidos más fácilmente detectables (*Predicted Highly Observable Peptides*) según esta librería.

Una forma complementaria de validar la fiabilidad de un péptido determinado, seleccionar sus mejores transiciones y optimizar los parámetros del análisis es el empleo de péptidos sintéticos marcados isotópicamente, como los péptidos AQUA™, durante el proceso de puesta a punto de los métodos de análisis (Liebler & Zimmerman 2013; Gerber *et al.*, 2003). En teoría, estos péptidos deberían comportarse de manera idéntica a sus análogos endógenos, permitiendo establecer los parámetros de análisis y las transiciones óptimas así como cuantificar de manera absoluta la concentración de proteína. En base a estas propiedades, decidimos incorporar una cantidad definida del péptido AQUA™ análogo a la secuencia “AGYPLEKPFDFR” de la proteína SPL. Sorprendentemente, nuestros análisis pusieron de manifiesto considerables diferencias entre el péptido sintético y el endógeno. Teniendo en cuenta que ambos péptidos comparten una secuencia de aminoácidos idéntica, cabría esperar que eluyesen al mismo tiempo en el análisis cromatográfico, sin embargo, los datos obtenidos muestran diferencias de 1-2 minutos. Estas diferencias no son triviales ya que condicionan las moléculas de la muestra que coeluyen con el analito y que son responsables en gran medida de la señal inespecífica (ruido). De hecho, el control de calidad basado en la relación señal/ruido reveló que las transiciones que cumplen los criterios definidos difieren entre el péptido endógeno y el marcado isotópicamente. A la vista de estos resultados, consideramos que los datos del péptido AQUA™ no podían considerarse fiables debido a factores indeterminados y decidimos prescindir de éste para normalizar o cuantificar el péptido endógeno.

Tras considerar las condiciones técnicas anteriormente descritas, decidimos considerar como fiables únicamente aquellos péptidos representados por más de una transición y como consistentes aquellos patrones basados en dos péptidos con un comportamiento coherente. En base a ello, sólo los resultados obtenidos para las proteínas beta-tubulina, hemoglobina y S1PR₄ pueden considerarse robustos. En el caso de la beta-tubulina, los dos péptidos analizados mantienen una concentración prácticamente constante tras la LME que coincide con su condición de proteína de mantenimiento (*housekeeping*) (Liu & Xu 2006). Este comportamiento valida la decisión tomada en este estudio de emplear la beta-tubulina como control de carga o normalizador. Es interesante destacar que, a pesar de su constancia a lo largo del tiempo, los dos péptidos analizados para esta proteína muestran una abundancia considerablemente distinta. Estudios previos demuestran que la señal de distintos péptidos proteotípicos de una misma proteína puede diferir en más de dos órdenes de magnitud (Picotti & Aebersold, 2012) y no supone ninguna contradicción para el análisis. En el caso de la hemoglobina, utilizada como indicadora de la entrada de células sanguíneas (concretamente eritrocitos) tras la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) a consecuencia del trauma (ver Winkler *et al.*, 2014 y referencias contenidas), la concentración aumenta drásticamente a 1dpo, momento en el que la hemorragia inducida por el trauma es máxima. La hemorragia, visible macroscópicamente, se atenúa a 3dpo y prácticamente desaparece a 7dpo (Profyris *et al.*, 2004), coincidiendo con la evolución del perfil de expresión de los péptidos seleccionados para esta proteína (Figura R2.2.B). La otra proteína también incorporada al estudio como indicadora de la ruptura de la BHE debido a su elevada concentración en suero, la albúmina, a pesar de estar representada por un único péptido, describe un patrón similar a la hemoglobina y coherente con los cambios descritos tras la LME (ver, por ejemplo, Hsu *et al.*, 1985). Este patrón también se observa en los dos péptidos empleados para analizar el receptor S1PR₄ sugiriendo que, en la médula espinal lesionada, el aumento de expresión de esta proteína característica del sistema inmune (Gräler *et al.*, 1998) podría deberse a la entrada de células sanguíneas.

El resto de proteínas presentó algún tipo de dificultad que no permite garantizar la fiabilidad de los patrones observados. En varias proteínas, sólo obtuvimos información cuantificable o al menos detectable de uno sólo de los péptidos analizados. En estos casos hemos considerado la información poco fiable, aunque en algunas proteínas los valores de ruido y las predicciones del SRMATlas parecen indicar que los resultados de ese único péptido podrían ser fiables. Este es el caso de la albúmina comentado previamente, pero también de la fosfatasa SPP2. La concentración de esta última proteína fue evaluada mediante el péptido “WPRPSFPPVVR” que presentó valores de la relación señal/ruido muy superiores a 10 (llegando incluso hasta 400) y es propuesto como de observación altamente probable en MRM según los algoritmos del RSM Atlas. Los valores de este péptido sugieren que esta fosfatasa apenas experimenta cambios de expresión durante la primera semana tras la lesión medular, contrariamente al descenso de su expresión génica observado en análisis de microarrays en un modelo murino de LME similar al presente (GEO database: GSE5296). Esta disparidad entre los cambios de ARNm y proteína es habitual y no invalida necesariamente el perfil obtenido del análisis del péptido “WPRPSFPPVVR”. Desafortunadamente, la ausencia de datos bibliográficos a nivel de proteína imposibilita confirmar los resultados y determinar fehacientemente la expresión de esta proteína tras la LME. La otra fosfatasa (SPP1) tampoco muestra cambios relevantes tras la LME, coincidiendo con la ausencia de cambios observados en el estudio de microarrays mencionado anteriormente. Sin embargo, en este caso los datos de MRM son muy poco fiables, con valores S/R aceptables únicamente en un péptido de baja probabilidad de observación según SRMATlas.

Por último, algunas de las proteínas en estudio están representadas por dos péptidos que no presentan patrones coherentes. Los casos más claros de incoherencia se observan entre los receptores S1PR₁ y S1PR₂ y, en menor medida, en el receptor 3 (S1PR₃), la esfingosina quinasa 2 (SphK2) y la S1P liasa (SPL). En base a los niveles de ruido y las predicciones del SRMATlas, los valores resultantes para los receptores tienen una fiabilidad muy limitada mientras que ésta aumenta en el caso de las enzimas SphK2 y SPL. Atendiendo a los dos péptidos analizados para la SphK2 la lesión medular causaría únicamente cambios menores en la expresión de esta enzima. Esta ausencia de cambios también se aprecia a nivel de expresión génica de acuerdo con el análisis de muestras de *Mus musculus* mediante microarrays mencionado anteriormente (GSE5296). Tampoco se han observado cambios a nivel génico en otros estudios de microarrays en modelos de LME en *Rattus norvegicus* (Natale *et al.*, 2003; GSE2392) ni en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Katsel *et al.*, 2007). Aunque los cambios de ARN no son necesariamente extrapolables a lo que ocurre a nivel proteico, su ausencia podría confirmar la ausencia de variaciones en los niveles de proteína que observamos en este estudio. Por su parte, la enzima SPL está representada por dos péptidos altamente probables, aunque sólo “AGYPLEKPFDFR” presenta una transición con niveles de S/R suficientes para realizar una cuantificación (S/R>10). En esta proteína, los dos péptidos analizados describen un aumento coherente de la expresión de SPL a 1 y 3dpo, que retorna a 7dpo a niveles similares a los observados en control. No obstante, mientras que los valores del péptido “AGYPLEKPFDFR” identifican claramente un máximo a 1dpo, los datos del péptido “TLPAQGMGTAEVLER” sugieren un aumento progresivo que se extiende hasta los 3dpo. Teniendo en cuenta estas disparidades y la importancia de la SPL en el contexto de la presente tesis doctoral, decidimos analizar la expresión de esta proteína mediante western blot para esclarecer cuál de los patrones propuestos en el MRM se ajusta más a la realidad. Aunque pueda parecer incoherente utilizar una técnica cualitativa como el WB, basada en anticuerpos de una especificidad cuestionable,

para confirmar datos cuantitativos obtenidos mediante MRM, cuya especificidad está validada por numerosos parámetros (tiempo de retención, m/z , etc.), suele ser una práctica habitual. De hecho, no es extraño que los revisores de artículos soliciten la validación de los datos cuantitativos de espectrometría de masas mediante WB (Aebersold *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos tras el análisis de SPL mediante WB confirman el fuerte aumento de su expresión a 1dpo y su posterior descenso hasta los 7 dpo descrito por el péptido “AGYPLEKPFDFR” sugiriendo que éstas podrían ser realmente las variaciones en la expresión de SPL tras la LME. Este perfil de expresión de SPL es similar al observado para las proteínas albúmina y hemoglobina, lo que podría indicar que el aumento de SPL es debido a la entrada de células exógenas, al igual que en el caso del receptor $S1PR_4$. Coherentemente, estudios previos han descrito la expresión de SPL en linfocitos T y B, en granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos e incluso en células CD68+ (marcador típico de macrófagos derivados de monocitos) (Borowsky *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2014). Según la evolución temporal de infiltración de células inmunes tras la LME descrita por Donnelly y Popovich (Donnelly & Popovich, 2008), el perfil observado para la proteína SPL coincide con la acumulación de neutrófilos a 1dpo y su posterior disminución hasta 7dpo tal y como se ilustra en la Figura R2.9. A pesar de que pueda parecer que toda la variación es debida únicamente a la entrada de estas células sanguíneas, no podemos descartar que esté ocurriendo simultáneamente un cambio local en la expresión de SPL en la médula espinal.

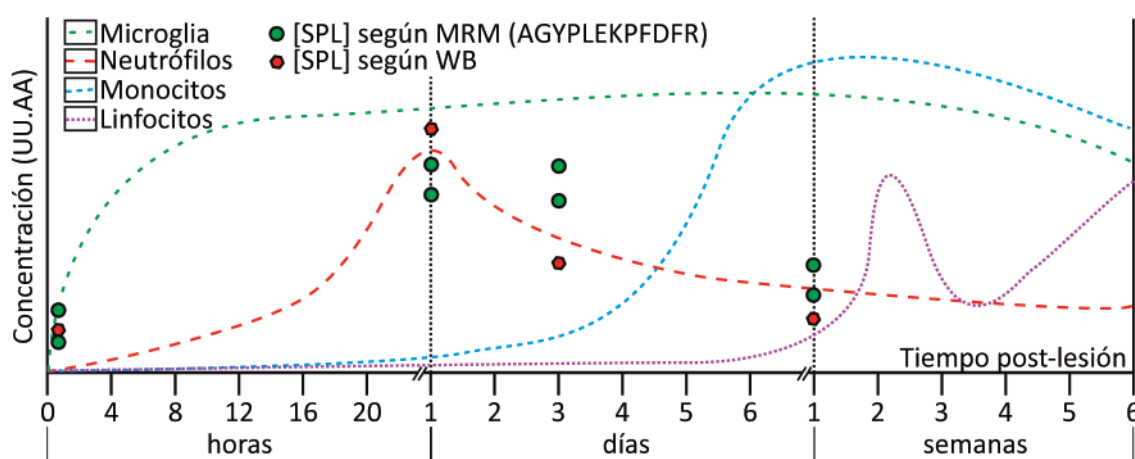


Figura R2.9. Evolución temporal de la infiltración de células inmunes y de la expresión de SPL tras la LME. Las líneas discontinuas hacen referencia a la infiltración en ratones de células inmunes. Los puntos verdes y rojos señalan la concentración de la proteína SPL según los análisis mediante MRM y WB, respectivamente. Modificado de Donnelly y Popovich (2008).

En conjunto, nuestros resultados demuestran cambios robustos a nivel de proteína en el receptor $S1PR_4$ y la enzima SPL, lo cual pone de manifiesto que tanto la ruta metabólica como la vía de señalización de S1P se encuentran alteradas en la primera semana tras la lesión medular. De hecho, el aumento de la expresión de SPL durante los primeros días tras el trauma podría explicar el descenso del ratio $S1P/Sph$, como se ha demostrado en otras patologías del sistema nervioso central, por ejemplo, en regiones dañadas del cerebro durante la enfermedad de Alzheimer (Ceccom *et al.*, 2014). En este sentido, es importante constatar que tanto en Alzheimer como en otras enfermedades (Brizuela *et al.*, 2012; Degagné *et al.*, 2014), la pérdida del equilibrio entre $S1P/Sph$ está asociado no sólo al aumento de la expresión de SPL sino también al descenso de la expresión y/o actividad de la

esfingosina quinasa 1. Interesantemente, nuestros resultados de MRM describen un patrón para SphK1 opuesto al de la enzima SPL, coherente con las observaciones realizadas en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, como ya hemos mencionado, las evidencias obtenidas en los ensayos de MRM para la mayor parte algunas de proteínas en estudio necesitan ser validadas y completadas por otros ensayos que nos permitan confirmar los perfiles e identificar las células involucradas antes de poder establecer de forma fiable los mecanismos implicados en la alteración del metabolismo de la S1P tras la LME.

Una vez establecido que la expresión de la proteína SPL varía tras la LME decidimos ampliar su caracterización para comprobar si estos cambios también ocurren a nivel de ARN mensajero (ARNm) y actividad enzimática. Nuestros resultados demuestran que los niveles de *Sgpl1*, gen codificante para la SPL, experimentan un aumento de su expresión, de acuerdo con lo observado en estudios previos en modelos de lesión medular tanto en ratón (GEO database: GSE5296 y GSE2392) como en rata (Biase *et al.*, 2005), así como en otras enfermedades del sistema nervioso central como Alzheimer (Katsel *et al.*, 2007). A pesar de la sobreexpresión de *Sgpl1* tras la LME, este incremento se produce de manera paulatina hasta los 7dpo sin justificar, en este sentido, el notable aumento de la proteína SPL a 1dpo. Como ya hemos mencionado en el caso de la SPP2, no es de extrañar la escasa capacidad predictiva de los niveles de expresión proteica a partir de los niveles de ARNm. De hecho, algunos estudios sugieren que una correlación del 40% ($R^2=0,4$) entre los niveles de ARNm y proteína está en los rangos esperables (Kendrick 2012). Entre los posibles motivos subyacentes a esta falta de capacidad predictiva se encuentran diversos mecanismos de regulación post-transcripcional, incluyendo los microARNs (miARNs); secuencias de ~23 nucleótidos capaces de regular simultáneamente cientos de genes inhibiendo la traducción de un mRNA a proteína (Bartel 2009). Interesantemente, el microARN miR-125b –capaz de inhibir la traducción de SPL según evidencias experimentales y bioinformáticas (Le *et al.*, 2009)- muestra un descenso significativo en modelos murinos de LME (Diaz Quiroz *et al.*, 2014; Yunta *et al.*, 2012) que podrían explicar parcialmente las discrepancias entre los perfiles de mRNA y proteína. No obstante, estos no son los únicos mecanismos de regulación sino que, tanto a nivel post-transcripcional como post-traduccion, existen numerosas modificaciones que también son determinantes en los niveles de expresión proteica. Es más, las disparidades entre los perfiles de ARN y proteína también pueden reflejar diferencias en su origen celular, de forma que, por ejemplo, los cambios a nivel de proteína podrían deberse principalmente a la entrada de células sanguíneas mientras que los cambios en el ARN podrían derivar de cambios en la expresión de las células neurales. Establecer los mecanismos que subyacen a estas disparidades requeriría análisis adicionales, en particular, ensayos de modulación de la expresión génica. En este sentido, en los últimos años se han desarrollado herramientas, incluyendo varias cepas de ratones transgénicos con expresión reducida de *Sgpl1* (Veldhoven 2005; Billich *et al.*, 2013), que facilitarían evaluar si los cambios inducidos a nivel genético repercuten en efectos a nivel proteico o son consecuencia indirecta de otros procesos. Asimismo, estas herramientas permitirían estudiar las consecuencias funcionales de la inhibición de la expresión de *Sgpl1* tras la lesión medular y evaluar así la viabilidad de la modulación de la SPL como terapia para el tratamiento de la lesión medular.

De cara a la aplicabilidad clínica, la implementación de terapias farmacológicas supera indiscutiblemente a las de tipo genético, resultando de elevado interés conocer cómo evoluciona la actividad enzimática de la diana terapéutica. Por ello, decidimos caracterizar la evolución de la actividad de la SPL tras la LME, lo que podría permitir plantear estrategias farmacológicas para su modulación. La actividad de SPL tras la lesión medular muestra un ligero descenso a 1dpo seguido de un aumento progresivo hasta los 7dpo. Este patrón es completamente diferente al esperable según el perfil observado a nivel de ARNm o de proteína e incoherente con lo esperado considerando el perfil de S1P.

La inconexa relación entre la expresión génica, la expresión de proteína y la actividad de SPL observada en este estudio no es una evidencia aislada. En 2012, Gorshkova y colaboradores pusieron de manifiesto que cambios altamente significativos en la expresión de ARNm ($p < 0,001$) no redundaban en cambios proporcionales de expresión proteica ni tampoco en la actividad de SPL (Gorshkova *et al.*, 2012). La falta de coherencia entre los cambios en la expresión de proteína y su actividad es particularmente llamativa, más aun considerando que las muestras empleadas para ambos análisis provienen de los mismos individuos. Existen varias posibilidades que podrían explicar esta disparidad. En primer lugar, la disminución de actividad a 1dpo podría reflejar un descenso en la disponibilidad de piridoxal-5'-fosfato (PLP), el cofactor necesario para la actividad SPL. Este cofactor es la forma activa de la vitamina B6, por lo que su disponibilidad puede ser regulada en función de la alimentación (Ye *et al.*, 2010). De hecho, el pienso Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet (Harlan™) utilizado en la alimentación de los animales del presente estudio contiene un suplemento de 17,8mg/Kg de vitamina B6. Considerando que la inapetencia típica de los animales en los primeros días tras la LME se revierte progresivamente durante la primera semana, el perfil de actividad SPL tras la lesión podría reflejar una falta de disponibilidad de piridoxina y, por tanto, menor concentración de PLP. Sin embargo, la regulación de la actividad SPL tras la lesión medular por la disponibilidad de PLP es poco probable ya que al realizar los ensayos de actividad añadimos PLP a concentraciones no limitantes. Es más, los ensayos realizados sin añadir el cofactor dieron lugar a resultados similares (Figura R2.7), descartando que la concentración de PLP sea limitante. Alternativamente, las variaciones en la composición de la médula espinal podrían afectar directamente al ensayo de actividad SPL. Este ensayo está basado en la medición de la fluorescencia emitida por la umbeliferona sintetizada tras la actividad de SPL. Según Acker y Auld (Acker & Auld 2014), cualquier ensayo basado en fluorescencia —especialmente aquellos que utilizan umbeliferona— necesita tener en cuenta aspectos como los efectos del filtro interno. Estos efectos implican la absorción de la longitud de onda a la que emite el fluoróforo por parte de otras moléculas o las interferencias con compuestos de la muestra que emitan a la misma longitud de onda. Entre los compuestos que podrían interferir en los ensayos de fluorescencia algunos estudios han puesto de manifiesto que, dependiendo de las condiciones, la albúmina puede reducir la intensidad de fluorescencia (Plášek *et al.*, 1996). Por tanto, el descenso de la fluorescencia a 1dpo podría ser consecuencia, no tanto de un descenso de la actividad de SPL, sino del aumento en la concentración de albúmina observado en la médula espinal. No obstante, ensayos exploratorios realizados en nuestro laboratorio combinando distintas cantidades de albúmina y umbeliferona no mostraron un descenso de la fluorescencia asociada a mayores concentraciones de BSA (datos no mostrados).

Existen otras justificaciones plausibles que pueden explicar la disparidad en los perfiles de proteína y actividad, como las modificaciones post-traduccionales de la enzima. De hecho, Gorshkova y colaboradores (2012) ya propusieron la existencia de mecanismos endógenos que afectan a la actividad de la SPL para explicar las disparidades observadas a este respecto. Otros estudios previos sugieren potenciales modificaciones post-traduccionales de la SPL por fosforilación, acetilación o, incluso, nitración (recogidas en Uniprot: Q8R0X7) que podrían alterar la actividad de su enzima. Estas modificaciones están descritas, en la mayoría de casos, en aminoácidos de la región donde el cofactor (PLP) se une a la enzima (F-167; A-452), a excepción de la fosforilación (S-564). Asimismo, se ha identificado la presencia de SPL humana durante un ensayo de cribado (*screening*) de proteínas nitrosiladas, observando nitrosilaciones en los residuos de tirosina 356 y 366 que podrían estar regulando su actividad enzimática (Zhan & Desiderio 2006). Aunque no existen estudios que respalden la modificación de la SPL tras la lesión medular, la posibilidad de la nitración y/o nitrosilación de la proteína resulta especialmente plausible, ya que los procesos de isquemia-reperfusión asociados a la lesión medular inducen la generación de especies reactivas del nitrógeno durante los primeros días tras el trauma. De hecho, Liu y su equipo demostraron mediante inmunohistoquímica que la nitración en residuos de tirosina aumenta significativamente a 12 y 24h tras la LME (Liu *et al.*, 2000). Una pérdida de la actividad SPL asociada a su nitración explicaría por qué, a pesar de su fuerte aumento de expresión proteica registrado a las 24 horas, la actividad resultante no muestra un aumento paralelo. Sin embargo, según el estudio de Liu *et al.* (2000), la nitración se mantiene elevada durante toda la primera semana después de la lesión, de forma incoherente con el aumento progresivo de la actividad enzimática que se registra durante esta primera semana según nuestros resultados.

Además de la falta de concordancia entre los niveles de actividad y su expresión a nivel génico y proteico, como ya hemos mencionado anteriormente, la actividad tampoco muestra el patrón esperable según la concentración de S1P. De hecho, resulta especialmente interesante el paralelismo entre el patrón de la S1P y la actividad de SPL tras la lesión medular. Este paralelismo sugiere una relación estrecha entre sustrato y actividad enzimática, que podría indicar la existencia de una modulación recíproca. En este sentido, existen diversas evidencias de la actividad de los esfingolípidos como reguladores de su propia ruta metabólica. Así, estudios previos han demostrado que la miriocina, un análogo estructural de la esfingosina (Sph), actúa como inhibidor de la serina palmitoil transferasa (SPT) (Wadsworth *et al.*, 2013), una enzima iniciadora de la síntesis *de novo* que, al igual que la SPL, depende de PLP. Coherentemente, la adición de esfingosina reduce la incorporación de serina en la síntesis de esfingolípidos, sugiriendo una posible regulación de la síntesis *de novo* (Echten *et al.*, 1990). Asimismo, se ha demostrado que la S1P es capaz de regular la actividad de la ceramida sintasa 2 (CerS2) (Laviad *et al.*, 2008). Es más, algunos estudios han puesto de manifiesto que la actividad de las enzimas dependientes de PLP es inhibida mediante mecanismos de inhibición suicida (*site-dependent inhibition*) por diferentes compuestos, incluyendo los aldehídos (Merrill 2002). En este sentido, el aldehído hexadecenal resultante de la degradación de S1P podría ser el responsable último de la modulación de la actividad de la enzima SPL por parte de S1P. En caso de confirmarse que S1P es capaz de regular la actividad de SPL, la concentración de S1P podría ser clave en la regulación de la ruta de los esfingolípidos. De hecho, considerando: 1) la posible regulación del único punto de salida de la ruta de los esfingolípidos por la S1P, 2) las evidencias de la regulación de la síntesis *de novo* por Sph y 3) la estrecha relación entre las concentraciones de

ambos metabolitos, resultaría razonable plantear que el equilibrio S1P/Sph esté actuando como regulador clave de los procesos de síntesis y degradación de los esfingolípidos y, por tanto, de todo el metabolismo de esta familia. No obstante, sería imprescindible realizar estudios en detalle que permitiesen confirmar esta hipótesis.

En resumen, tras haber comprobado en el primer apartado de esta tesis que la concentración de la S1P y su equilibrio con la Sph están alterados significativamente después de la lesión medular, el objetivo principal de este segundo apartado era evaluar la existencia de cambios en la ruta metabólica de la S1P, prestando especial atención a la enzima SPL y evaluando su potencial terapéutico tras la LME. La caracterización detallada de los niveles de SPL ha permitido constatar que se produce un aumento general de la expresión génica, proteína y actividad de SPL durante la primera semana tras la lesión. Estos resultados abren la posibilidad de que la inhibición de la expresión o actividad de SPL mediante terapias genéticas o farmacológicas pueda servir para aumentar la concentración de S1P tras la lesión medular.

CAPÍTULO III

Efectos de la inhibición génica parcial de la esfingosina-1-fosfato liasa

INTRODUCCIÓN

Los resultados descritos en apartados precedentes de la presente tesis demuestran que la lesión medular induce cambios tanto en el sistema de esfingolípidos como en determinadas enzimas responsables del metabolismo de la S1P, particularmente en la encargada de su degradación irreversible, la SPL. Sin embargo, aún permanece sin dilucidar si la modulación de la ruta metabólica de S1P puede tener efecto sobre eventos desencadenados a causa del trauma medular. Así pues, el objetivo principal del presente apartado es evaluar si la inhibición de la expresión génica de la SPL reduce los daños asociados a la lesión medular.

Una de las herramientas biológicas disponibles para abordar este estudio es el empleo de ratones transgénicos deficientes en el gen *Sgpl1*. No obstante, distintas referencias bibliográficas han puesto de manifiesto la inviabilidad de los ratones homocigotos carentes de *Sgpl1* (SPL^{-/-}) más allá del periodo de lactancia (Vogel *et al.*, 2009). En este sentido es necesario destacar que para las cirugías implicadas en el modelo de lesión medular por contusión empleado en esta tesis se requieren animales de aproximadamente 3,5 meses de edad. Por ello, los ratones transgénicos empleados en este apartado corresponden a ratones heterocigotos parcialmente deficientes en *Sgpl1* (SPL^{+/-}).

La experimentación llevada a cabo en el presente apartado puede diferenciarse en dos bloques: análisis a largo plazo y análisis a corto plazo. Por una parte y para alcanzar el objetivo principal propuesto, analizamos el efecto a largo plazo (56dpo) de la deficiencia de SPL sobre las pérdidas tisulares y funcionales resultantes de la lesión medular, comparando ratones transgénicos deficientes en *Sgpl1* (SPL^{+/-}) con ratones silvestres (*wild type*; WT). Durante todo el ensayo, evaluamos la recuperación funcional empleando tests específicos tanto para el comportamiento motor (BMS, rotarod y versamax) como para la sensibilidad a estímulos mecánicos (test de Von Frey) y térmicos (tests de placa caliente y de acetona). Además, empleamos técnicas histológicas (tinción con eriocromo-cianina) y de inmunofluorescencia (contajes automatizados de células neurales y microglía marcadas) para analizar los efectos de la inhibición parcial de la SPL a nivel tisular y celular. Por otra parte, complementamos estos estudios con ensayos a corto plazo de los efectos moleculares de la inhibición parcial de *Sgpl1* tras la lesión medular. Para ello, durante la primera semana tras el trauma realizamos análisis de la expresión y actividad de la SPL así como de la concentración de S1P y otros esfingolípidos, mediante técnicas de qPCR, WB, MRM, ensayos de actividad enzimática y UPLC-MS/MS, respectivamente. Considerando que la información previa disponible sugiere que la inhibición de SPL en el sistema nervioso central no es tan efectiva como en otros tejidos (Billich *et al.*, 2013; Van Veldhoven, P.P. Comunicación personal), decidimos incorporar a nuestros análisis muestras de timo. El timo es uno de los órganos con mayor expresión de *Sgpl1* (Borowsky *et al.*, 2012) y muestra una reducción significativa en la expresión y actividad de SPL en ratones parcialmente deficientes de *Sgpl1* (Bektas *et al.*, 2010; Billich *et al.*, 2013), permitiendo atestiguar los efectos de la inhibición parcial de la enzima en nuestro modelo. Además, debido a la naturaleza heterogénea del sistema nervioso central, decidimos incorporar tejido cerebral en los distintos análisis para poder evaluar si los efectos observados en médula espinal son propios de este tejido o comunes en el sistema nervioso central.

Para favorecer la comprensión de los distintos ensayos, el diseño experimental empleado en cada análisis será descrito en el desarrollo de la sección correspondiente.

RESULTADOS

LOS RATONES $SPL^{+/-}$ PRESENTAN UNA EXPRESIÓN REDUCIDA DE $SGPL1$ EN MÉDULA ESPINAL

Para la cría de este tipo de ratones empleamos progenitores heterocigotos (+/-) cuya descendencia, en base a la genética mendeliana, debería corresponder a un 50% de transgénicos parcialmente deficientes en $Sgpl1$ ($SPL^{+/-}$), un 25% de individuos sin mutación ($SPL^{+/+}$) y un 25% de individuos completamente deficientes en $Sgpl1$ ($SPL^{-/-}$). Visualmente los ratones transgénicos y silvestres son indistinguibles por lo que resulta imprescindible realizar el correspondiente genotipado, detectando la mutación por la inserción del gen reportero de la beta-galactosidasa en el gen $Sgpl1$ (Figura R3.1). Todos los detalles relacionados con los procedimientos relativos al genotipado se encuentran detallados en la correspondiente sección del apartado Materiales y métodos.

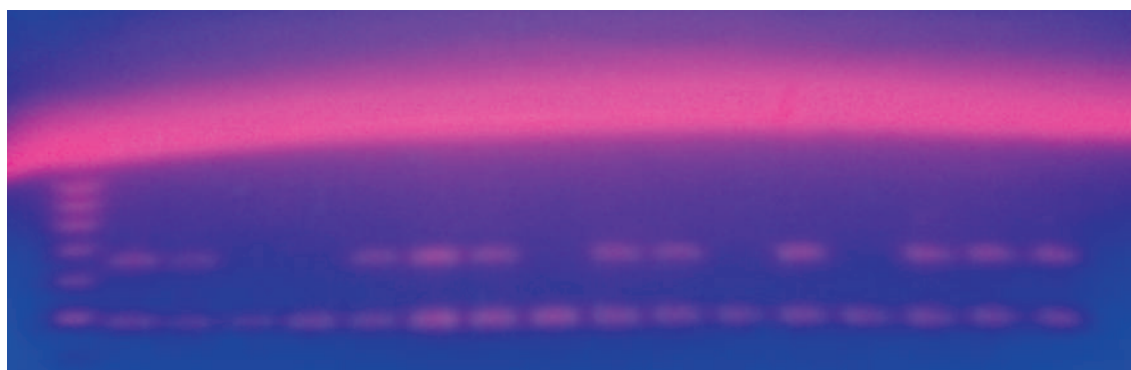


Figura R3.1. Genotipado de ratones transgénicos. La imagen ilustra los resultados obtenidos tras el genotipado de una camada elegida aleatoriamente. El carril izquierdo corresponde a los marcadores de peso molecular (100pb). El resto de carriles corresponden a muestras de ADN provenientes de los distintos individuos. El doble bandeo indica la condición de deficiencia parcial en $Sgpl1$ ($SPL^{+/-}$), en la que la banda inferior (499pb) corresponde al gen $Sgpl1$ y la superior (667pb) al gen reportero ($LacZ$). Las muestras representadas por una única banda a 499pb corresponden a animales sin mutación génica ($SPL^{+/+}$).

La Tabla R3.1 resume la distribución de individuos transgénicos y silvestres en nueve ensayos representativos. En general, empleamos ratones hembra para los distintos estudios llevados a cabo, de modo que restringimos el análisis de machos para la selección de progenitores, motivo por el cuál en algunos ensayos no hay datos relativos a la cantidad de machos por camada. Tal y como puede apreciarse en la tabla, en ningún momento detectamos animales homocigotos $SPL^{-/-}$. Esta ausencia explica las diferencias entre porcentaje de distribución observada (aprox. 33% $SPL^{+/+}$ vs 66% $SPL^{+/-}$) frente a la esperable según la genética mendeliana.

Considerando la letalidad de los ratones transgénicos $SPL^{-/-}$ después del periodo de lactancia (21 días) y que habitualmente realizamos los estudios de genotipado tras el destete, podríamos asumir que la ausencia de ratones carentes de SPL es debida a la muerte prematura de los mismos. Sin embargo, en estudios de genotipado que llevamos a cabo en ratones neonatos (P0-P3; datos no mostrados), así como en muestras de ratones muertos sin causa aparente durante el periodo de lactancia, tampoco se identificaron ratones $SPL^{-/-}$, manteniéndose en todo momento la proporción 1:2 mostrada en la Tabla R3.1.

	Hembras		Machos		Totales		Total	Porcentajes Totales	
	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-		+/+	+/-
Exp. 1	3	5	-	-	3	5	8	37,50	62,50
Exp. 2	5	6	-	-	5	6	11	45,45	54,55
Exp. 3	4	7	1	4	5	11	16	31,25	68,75
Exp. 4	1	8	1	4	2	12	14	14,29	85,71
Exp. 5	1	2	4	5	5	7	12	41,67	58,33
Exp. 6	3	11	-	-	3	11	14	21,43	78,57
Exp. 7	6	8	0	3	6	11	17	35,29	64,71
Exp. 8	4	15	-	-	4	15	19	21,05	78,95
Exp. 9	9	7	9	3	18	10	28	64,29	35,71
							\bar{X}	34,69	65,31
							S.D.	15,12	15,12

Tabla R3.1. Distribución típica de animales SPL+/- y SPL+/+. La tabla resume el número (y el porcentaje correspondiente) de animales transgénicos y silvestres separados por sexo en nueve camadas representativas. El símbolo “-” denota individuos no evaluados.

Antes de realizar los ensayos a largo y corto plazo, decidimos evaluar las diferencias en los niveles de expresión de Sgpl1 entre ratones transgénicos y silvestres. Para ello, analizamos mediante qRT-PCR la abundancia de ARNm de Sgpl1 en muestras de médula espinal, timo y cerebro de ratones WT¹³ y SPL+/- . Los resultados obtenidos en este análisis se recogen en la Tabla R3.2 y se ilustran en la Figura R3.2. Como se aprecia en la gráfica, los ratones transgénicos muestran una tendencia general a expresar

Muestra	Genotipo	Sgpl1		18S		\bar{X}		ΔCt		
		Medida 1	Medida 2	Medida 1	Medida 2	Sgpl1	18S	ΔCt	\bar{X}	S.D.
Médula	WT	32,402	31,295	16,755	16,875	31,849	16,815	15,033	14,475	0,965
		31,197	29,872	16,046	17,019	30,535	16,533	14,002		
		35,152	33,599	18,406	18,394	34,376	18,400	15,976		
		31,213	N.D.	16,921	16,210	31,213	16,565	14,648		
		31,086	29,280	16,142	16,277	30,183	16,210	13,973		
		33,644	32,976	20,264	19,925	33,310	20,094	13,216		
	SPL +/-	33,476	32,566	16,714	17,238	33,021	16,976	16,045	15,662	0,372
		35,260	34,542	20,048	19,152	34,901	19,600	15,301		
		32,378	31,722	15,876	16,942	32,050	16,409	15,641		
Timo	WT	26,986	27,044	17,468	17,007	27,015	17,237	9,778	11,627	2,217
		25,837	25,878	15,160	15,090	25,857	15,125	10,732		
		24,287	24,424	15,173	15,125	24,356	15,149	9,207		
		28,047	28,325	14,774	14,739	28,186	14,757	13,429		
		30,032	30,632	15,085	15,616	30,332	15,350	14,982		
		26,732	26,688	15,215	14,937	26,710	15,076	11,634		
	SPL +/-	31,375	31,641	16,436	16,628	31,508	16,532	14,976	14,822	0,787
		29,263	29,260	15,351	15,232	29,261	15,292	13,970		
		34,759	35,587	19,863	19,440	35,173	19,651	15,521		
Cerebro	WT	31,531	31,891	15,206	15,848	31,711	15,527	16,184	13,746	1,926
		28,688	29,265	14,552	14,614	28,976	14,583	14,394		
		26,843	27,303	14,866	14,770	27,073	14,818	12,254		
		26,991	27,262	14,942	15,004	27,126	14,973	12,153		
	SPL +/-	30,767	31,428	14,902	15,335	31,098	15,119	15,979	16,289	0,290
		31,767	32,232	15,495	15,837	31,999	15,666	16,333		
		34,092	35,189	17,771	18,402	34,641	18,086	16,554		

Tabla R3.2. Expresión génica de Sgpl1 en ratones transgénicos y silvestres. La tabla muestra la expresión de Sgpl1 y de la subunidad ribosomal 18S (control endógeno) en muestras de médula espinal, timo y cerebro de ratones transgénicos (SPL+/-) y silvestres (WT). La expresión génica se expresa en valores umbral de ciclo (Ct). Las medidas 1 y 2 corresponden a las replicaciones técnicas (duplicados) de las distintas muestras. ΔCt = valores umbral de ciclo normalizados respecto a 18S. \bar{X} = media; S.D.= desviación estándar.

¹³De aquí en adelante, si no se especifica lo contrario, los ratones SPL+/+ serán considerados como ratones silvestres (WT) ya que la colonia de transgénicos fue refrescada periódicamente con progenitores silvestres y ambos pueden asumirse comparables al carecer de la mutación en el gen Sgpl1.

menos *Sgpl1*, aunque de forma más marcada en el timo y menos en la médula espinal (mayor número de ciclos (Ct o ΔCt) indica menor cantidad de ARNm). El test estadístico de la t de Student¹⁴ empleado para analizar estas variaciones demuestra que las diferencias son significativas al 90% (médula espinal, $t=-2,001$, $p=0,085$; timo, $t=-2,353$, $p=0,051$; cerebro, $t=-2,601$, $p=0,076$).

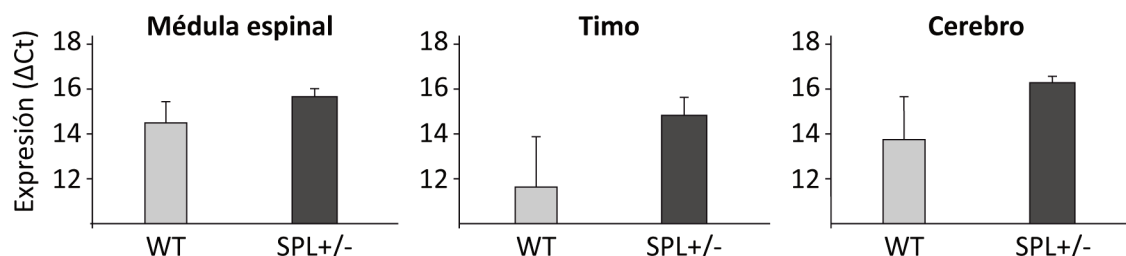


Figura R3.2. Diferencias en la expresión de *Sgpl1* entre individuos transgénicos y silvestres. La grafica ilustra las diferencias de expresión génica de *Sgpl1* entre ratones silvestres (WT) y transgénicos (SPL+/-) en muestras de médula espinal, timo y cerebro. WT: $n=6$ ind/grupo, a excepción de cerebro donde $n=4$ ind/grupo; SPL+/-; $n=3$ ind/grupo.

En estos ensayos empleamos ratones excedentes de 12 meses con la intención de cumplir la regla de las 3R de la experimentación animal (reemplazar, reducir y refinar). Sin embargo, al no poder descartar discrepancias en la expresión génica debidas a la edad, particularmente considerando la involución del timo tras la pubertad, decidimos realizar un experimento exploratorio evaluando machos y hembras transgénicos y silvestres de 3,5 meses, edad habitual para las cirugías del modelo de lesión medular por contusión empleado en estos estudios. En la Tabla R3.3 se detallan los resultados de expresión de *Sgpl1* ilustrados en la Figura R3.3, donde se observa claramente que la expresión de *Sgpl1* es menor en ratones SPL+/- que en ratones WT, tanto en médula espinal como en timo y cerebro. Estas evidencias permiten asumir que los resultados observados en ratones de 12 meses se mantienen, o incluso se acentúan, en ratones jóvenes. Estos resultados preliminares serán completados en detalle más adelante, en este mismo apartado, al evaluar las diferencias de expresión de *Sgpl1* entre ratones WT y SPL+/- durante la primera semana tras la LME.

Tejido	Sexo	Genotipo	Sgpl1		18S		\bar{x}		ΔCt
			Medida 1	Medida 2	Medida 1	Medida 2	Sgpl1	18S	
Médula espinal	Hembras	SPL +/-	32,973	32,058	17,103	16,617	32,515	16,860	15,655
		WT	31,582	31,043	18,022	17,649	31,312	17,836	13,477
	Machos	SPL +/-	33,654	34,166	17,289	17,120	33,910	17,205	16,705
		WT	31,959	31,430	17,167	17,140	31,695	17,153	14,541
Timo	Hembras	SPL +/-	28,336	28,739	16,305	16,300	28,538	16,303	12,235
		WT	27,985	27,691	17,029	16,858	27,838	16,943	10,895
	Machos	SPL +/-	29,297	28,682	16,740	16,409	28,989	16,575	12,415
		WT	27,325	27,081	17,045	16,910	27,203	16,978	10,226
Cerebro	Hembras	SPL +/-	32,104	32,308	16,854	16,923	32,206	16,888	15,317
		WT	31,156	31,174	17,948	18,329	31,165	18,138	13,026
	Machos	SPL +/-	33,544	33,324	17,447	17,687	33,434	17,567	15,867
		WT	31,150	31,468	16,913	17,270	31,309	17,092	14,217

Tabla R3.3. Expresión génica de *Sgpl1* en ratones jóvenes transgénicos y silvestres. La tabla muestra la expresión de *Sgpl1* y de la subunidad ribosomal 18S en muestras de médula espinal, timo y cerebro de ratones WT y SPL+/- de 3,5 meses de edad diferenciados según su sexo. La expresión génica se expresa en valores umbral de ciclo (Ct). Las medidas 1 y 2 corresponden a las replicaciones técnicas (duplicados) de las distintas muestras. ΔCt = valores umbral de ciclo normalizados respecto a 18S.

¹⁴La metodología empleada para este análisis estadístico se detalla en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos.

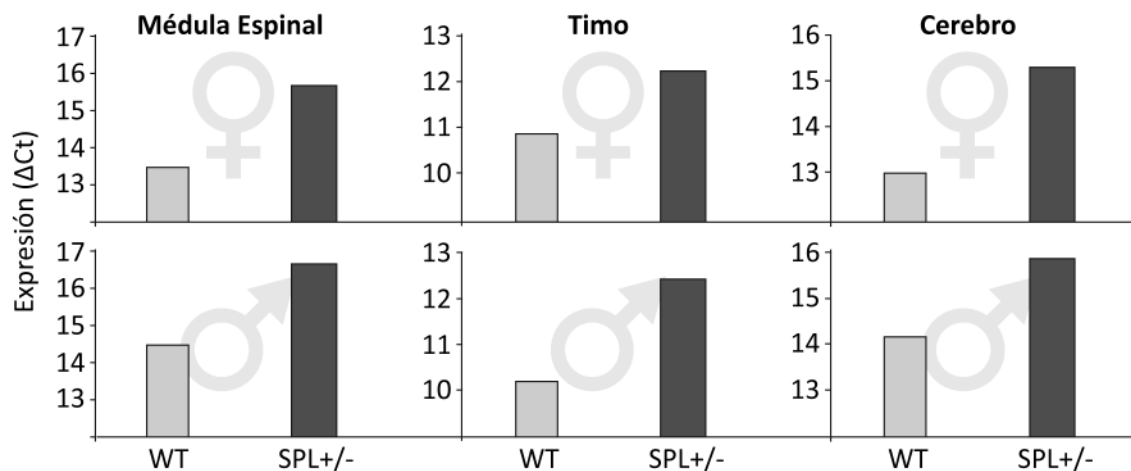


Figura R3.3. Diferencias en la expresión génica de *Sgpl1* entre ratones jóvenes transgénicos y silvestres. La grafica ilustra las diferencias de expresión génica de *Sgpl1* entre ratones silvestres y SPL+/- en muestras de médula espinal, timo y cerebro. En todos los casos, $n=1$ ind/grupo y sexo.

EFECTOS DE LA DEFICIENCIA EN SGPL1 SOBRE LOS DAÑOS INDUCIDOS POR LA LESIÓN MEDULAR

Para evaluar los efectos de la deficiencia de expresión génica de *Sgpl1* en la recuperación funcional y en la preservación tanto tisular como celular, realizamos dos ensayos aleatorizados independientes comparando ratones SPL+/- con ratones WT. Iniciamos el estudio con $n=5$ ind/grupo y $n=7$ ind/grupo para el primer y segundo ensayo, respectivamente. Sin embargo, algunos de los individuos perecieron en el transcurso de las cirugías o debido a complicaciones post-operatorias. En consecuencia, evaluamos $n=3$ ratones SPL+/- y $n=4$ ratones WT en el primer ensayo y $n=5$ ratones SPL+/- y $n=6$ ratones silvestres en el segundo ensayo.

Para la evaluación funcional (motora y sensitiva) realizamos una habituación de los animales a 5 y 2 días antes de las cirugías. La periodicidad de las evaluaciones motora y sensorial fue semanal a partir del día de la lesión (0dpo). Adicionalmente, realizamos un primer estudio de BMS a dos días tras las cirugías (2dpo) para evaluar la eficiencia de la lesión y excluir aquellos animales que, como mencionamos anteriormente, tuviesen una movilidad superior a la esperada. A tiempo final (56dpo), los animales fueron sacrificados y perfundidos con una solución de paraformaldehído al 4% en solución salina. Las muestras de médula espinal obtenidas fueron procesadas y empleadas para los estudios de preservación tisular y celular que se describirán más adelante en esta sección. Toda la información relativa a los procedimientos quirúrgicos, los tests empleados para la evaluación funcional, la metodología utilizada en los estudios histológicos e inmunohistoquímicos y los análisis estadísticos realizados en esta sección, se encuentra detallada en el apartado correspondiente de Materiales y métodos.

La evaluación funcional realizada en esta sección puede diferenciarse en dos partes, motora y sensitiva, que serán descritas en el orden citado.

Análisis de la función motora

Analizamos la función motora empleando, en primer lugar, el test BMS. Este análisis del comportamiento en campo abierto es el test más empleado para evaluar la recuperación motora en ratones tras la lesión medular, atendiendo a la articulación del tobillo y a otros eventos como el soporte de peso o la estabilidad del tronco. Los datos obtenidos en el test BMS se muestran en el material suplementario de esta sección (Sup.Mat.14; Pág. 295) y de manera resumida en la Tabla R3.4. Como se aprecia en las gráficas de la Figura R3.4.A y B, los ratones SPL+/- muestran una mayor recuperación en los primeros días tras la LME. De acuerdo con el test de rangos de Wilcoxon (Figura R3.4.C) ajustado para múltiples comparaciones, esta tendencia es claramente significativa en el Subscore del primer ensayo y cercanos a los valores de significación en el Score, mientras que en el segundo ensayo las diferencias no son significativas a pesar de que la tendencia se mantiene, especialmente en los primeros días.

		Exp. I				Exp. II			
		WT		SPL +/-		WT		SPL +/-	
	dpo	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.
Score	2	0,50	0,58	2,33	1,04	0,50	0,77	1,20	1,15
	7	3,63	1,25	5,00	0,00	2,75	1,08	4,10	1,82
	14	5,00	0,00	5,67	1,15	4,17	0,93	4,20	1,92
	21	5,00	0,00	6,33	1,15	4,75	0,42	4,00	1,22
	28	5,00	0,00	5,00	0,00	4,92	0,20	5,00	0,71
	35	5,00	0,00	6,00	1,73	5,00	0,00	4,80	0,45
	42	5,00	0,00	5,00	0,00	5,17	0,41	4,70	0,67
	49	5,00	0,00	7,00	1,73	5,00	0,00	4,90	0,89
SubScore	56	5,13	0,25	5,67	1,15	5,00	0,00	5,10	1,02
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7	0,00	0,00	1,67	2,08	0,00	0,00	1,40	3,13
	14	2,75	0,96	7,00	1,73	0,67	0,82	2,20	3,90
	21	1,75	2,06	5,67	1,53	0,33	0,82	1,60	1,67
	28	2,75	2,22	4,00	0,00	3,33	2,50	3,80	3,63
	35	3,50	1,29	8,00	1,73	3,00	1,79	3,20	3,35
	42	4,75	1,71	7,67	0,58	4,50	1,87	3,20	3,03
	49	3,25	1,50	8,00	1,73	3,67	2,34	2,60	3,97
	56	3,75	2,06	7,67	0,58	3,17	1,94	3,80	3,63

Tabla R3.4. Promedio de los valores de Score y Subscore. La tabla muestra el promedio de los valores de Score y Subscore de los ratones transgénicos y silvestres en las evaluaciones periódicas. Aunque no se refleja en la tabla, todos los animales analizados alcanzaron un Score y Subscore máximos (9 y 11, respectivamente) en las evaluaciones previas a la lesión. N=3 ratones SPL+/- y n=4 ratones WT para el Exp. I; y n=5 ratones SPL+/- y n=6 ratones WT para el Exp. II. Exp.=experimento, \bar{x} = media; S.D.= desviación estándar.

Además de la valoración general del test de BMS mediante el Score y Subscore, resulta especialmente interesante prestar atención al número de individuos capaces de alcanzar la coordinación entre extremidades al realizar los pasos. La coordinación (correspondiente a un Score mayor que 5) supone, habitualmente, un punto crítico en la recuperación de los ratones C57BL/6J, que pocos ejemplares silvestres consiguen alcanzar en este modelo de contusión moderada. Para analizar si la deficiencia génica de Sgpl1 favorece la capacidad de los ratones para recuperar una locomoción coordinada entre sus cuatro extremidades, realizamos un análisis estadístico basado en curvas de supervivencia empleando el modelo de regresión de Cox (ver apartado de materiales y métodos). Este tipo de regresión permite evaluar tanto si el genotipo de los animales influye en su capacidad para coordinar

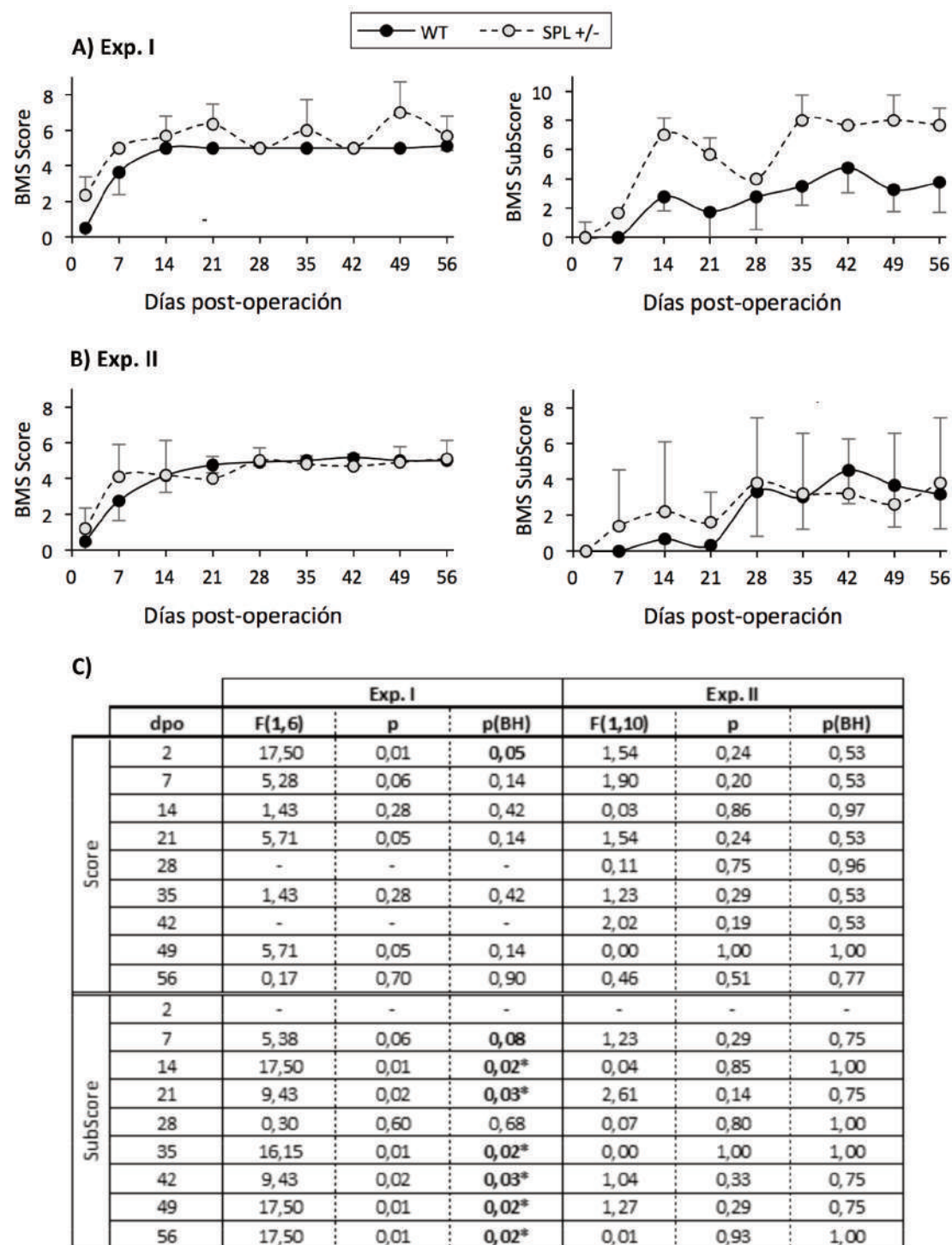


Figura R3.4. Diferencias en la recuperación motora entre ratones SPL+/- y WT (Test BMS). Las gráficas (A y B) ilustran los valores de Score y Subscore obtenidos mediante el test BMS en los dos ensayos independientes realizados para evaluar la recuperación motora tras la lesión medular. Los datos se expresan como promedio y desviación estándar. C) La tabla muestra los resultados del análisis estadístico de las diferencias entre animales WT y SPL+/- mediante el test de rangos de Wilcoxon. En ella se detallan el estadístico y sus grados de libertad ($F(a,b)$), la probabilidad de que los cambios observados entre ratones transgénicos y silvestres sean significativos (p) y la probabilidad ajustada según la corrección de múltiples comparaciones de Benjamini & Hochberg ($p(BH)$). El símbolo (*) indica una $p(BH) < 0,05$, señalada para facilitar la visualización de los datos. El texto en “negrita” indica una probabilidad significativa al 90% ($p(BH) < 0,1$). $n=3$ ratones SPL+/- y $n=4$ ratones WT para el Exp. I; y $n=5$ ratones SPL+/- y $n=6$ ratones WT para el Exp. II. Exp.=experimento.

tras la LME como a qué tiempos ocurren estas diferencias. Debido a que este test plantea limitaciones técnicas asociadas al reducido número de animales por experimento, decidimos incorporar los datos de los dos ensayos para evaluarlos mediante una única regresión de Cox. No obstante, incorporamos en este análisis el factor “experimento” como una variable adicional para evaluar si existían diferencias entre los ensayos que pudiesen suponer un artefacto, reduciendo o incrementando las diferencias entre ratones silvestres y transgénicos debidas exclusivamente al genotipo. Los resultados obtenidos tras el análisis estadístico permiten establecer que el genotipo afecta de manera significativa ($z=2,191$, $p=0,028$) sin depender significativamente del ensayo ($z=-1,810$; $p=0,070$). Como se aprecia en la Figura R3.5 la probabilidad de alcanzar la coordinación aumenta más rápidamente en los ratones transgénicos que en los silvestres. Según estas curvas, los animales SPL+/- tienen una probabilidad aproximada del 50% (Coordinación=0,5 en la gráfica) de coordinar sus movimientos a partir de las cinco semanas (35dpo), mientras que los animales silvestres no alcanzan esta probabilidad, ni siquiera tras 8 semanas (56dpo).

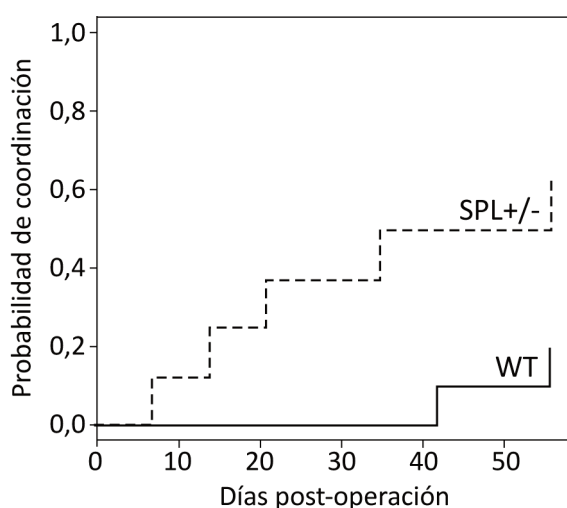


Figura R3.5. Curva de probabilidad de coordinación. La curva, ajustada según el modelo no paramétrico de Kaplan-Meier, muestra la probabilidad de que un ratón coordine a un tiempo determinado en función de su genotipo. Esta gráfica está representada como la inversa de la curva de supervivencia para facilitar la interpretación de los datos.

En segundo lugar, realizamos una evaluación complementaria de la coordinación y el equilibrio empleando el test de movimiento coordinado en cilindro rotatorio (Rotarod). Este test determina el tiempo que un ratón es capaz de permanecer sobre un cilindro (tiempo de latencia o latencia) cuya velocidad de rotación se incrementa paulatinamente (velocidad de giro o rpm). Los datos obtenidos se muestran en el material suplementario de esta sección (Sup.Mat.15; Pág. 296). Dado que los datos de tiempo de latencia y velocidad de giro correlacionan positivamente ($R^2>0,98$) y con el objetivo de simplificar el análisis de los datos, decidimos analizar únicamente los valores de latencia (Tabla R3.5). En este caso, realizamos la evaluación por triplicado ya que, en algunos casos, los animales se dejan caer del cilindro sin justificación aparente, dando lugar a una subestimación su capacidad. Para minimizar la repercusión de estas “caídas voluntarias”, analizamos el valor de latencia más elevado alcanzado por cada individuo en las tres réplicas de cada evaluación como estimación de la máxima capacidad del individuo en cada tiempo. En la Tabla R3.6 se muestran, a modo de resumen, los datos promediados de valores máximos atendiendo al genotipo de los ratones. Como se aprecia en la Figura R3.6.A, desde los primeros días tras la LME los ratones transgénicos alcanzan mayores valores de latencia que los ratones silvestres en el Exp. I mientras que, en el Exp. II, esta diferencia es mucho menor e incluso parece señalar una tendencia opuesta. El análisis estadístico mediante

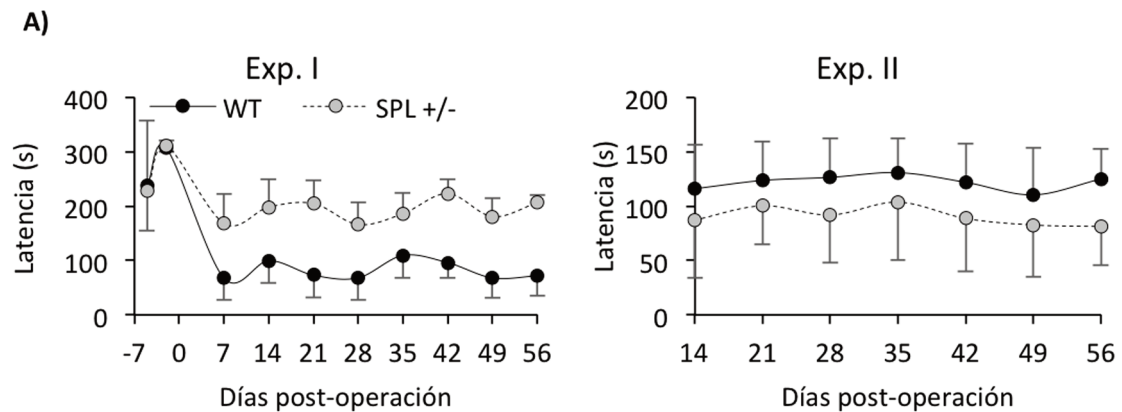
rangos de Wilcoxon permitió determinar que las diferencias observadas tras la LME en el Exp. I indican una recuperación significativamente mayor en los ratones SPL+/- que en los WT mientras que, en el segundo ensayo, no existen diferencias significativas entre animales. Al no existir diferencias significativas entre animales en el Exp. II podemos descartar que la recuperación de los ratones SPL+/- sea peor que la de WT, si bien podemos asumir que se comporta de manera inesperada respecto al primer ensayo y que, en este caso, inexplicablemente la recuperación es similar en ambos genotipos.

		Exp. I							Exp. II										
		WT				SPL +/-			WT						SPL				
dpo	Réplicas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
-5	1º	232	65	120	135	210	106	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2º	302	106	92	232	290	187	83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3º	310	244	70	279	323	280	77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2	1º	208	281	209	266	321	178	130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2º	313	305	298	292	305	305	305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3º	220	255	256	309	305	305	305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1º	37	10	39	8	69	106	177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2º	68	10	46	42	151	54	194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3º	98	8	91	72	193	84	206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1º	66	54	49	65	150	139	241	24	100	73	87	86	112	118	13	60	20	142
	2º	119	65	105	54	131	164	251	67	135	86	109	86	159	127	5	85	13	129
	3º	144	41	124	36	135	193	199	62	147	70	96	109	177	101	24	106	38	122
21	1º	62	72	122	22	133	168	254	75	150	19	74	123	26	17	19	48	76	128
	2º	76	31	41	8	142	184	220	88	151	73	110	132	38	65	43	94	15	162
	3º	49	27	119	11	176	115	177	100	164	72	110	132	162	90	79	88	55	160
28	1º	61	12	79	18	122	147	82	60	130	39	70	128	119	32	94	83	27	116
	2º	39	27	48	27	134	150	213	94	144	70	84	127	128	48	60	56	46	87
	3º	92	5	114	40	125	151	206	86	160	64	139	157	138	63	107	46	47	159
35	1º	110	74	128	28	137	183	153	81	127	67	92	123	145	52	109	65	42	154
	2º	60	49	82	52	139	185	167	62	135	66	107	133	164	46	110	28	68	194
	3º	87	147	30	37	160	231	167	98	138	86	141	157	146	67	74	79	55	171
42	1º	70	114	83	51	147	171	217	61	102	82	106	119	151	68	116	30	10	136
	2º	101	47	32	63	194	228	207	65	135	80	112	130	143	48	123	46	4	137
	3º	124	62	71	58	181	129	247	91	94	77	111	111	181	97	115	72	14	113
49	1º	62	16	33	30	142	206	142	16	98	49	135	118	122	29	111	77	3	111
	2º	73	51	65	26	155	169	104	57	96	71	157	109	161	45	119	95	16	105
	3º	116	39	75	21	193	207	112	51	88	57	76	78	147	39	139	95	23	76
56	1º	67	106	29	23	179	187	102	23	67	62	93	84	137	69	107	57	15	99
	2º	66	94	49	18	215	191	186	108	110	73	113	108	117	46	124	64	6	111
	3º	94	95	64	19	211	214	189	69	152	78	129	133	149	39	84	35	38	61

Tabla R3.5. Tiempo de latencia alcanzado por los ratones transgénicos y silvestres en el test Rotarod. La tabla muestra el tiempo de latencia alcanzado por los ratones en tres réplicas realizadas el mismo día pero con un margen aproximado de 15 minutos entre ellas. Las letras A-R corresponden a los animales evaluados. Exp.= experimento; dpo= días post-operación.

	Exp. I				Exp. II			
	WT		SPL +/-		WT		SPL +/-	
dpo	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.
-5	238,25	83,32	228,67	127,97	-	-	-	-
-2	306,25	6,40	310,33	9,24	-	-	-	-
7	67,75	40,04	168,33	54,37	-	-	-	-
14	99,50	40,67	198,00	50,69	115,83	40,20	87,40	53,28
21	73,00	40,87	204,67	42,91	123,50	36,00	100,20	35,34
28	68,25	41,46	166,00	41,58	126,33	36,30	91,80	43,76
35	109,25	41,05	186,00	39,13	130,67	31,71	103,60	53,44
42	96,00	28,08	223,00	26,85	121,83	35,71	88,60	48,57
49	68,00	36,91	180,67	34,21	110,33	43,24	82,60	47,72
56	71,75	36,99	206,00	14,73	124,83	27,87	81,20	35,46

Tabla R3.6. Promedio del tiempo de latencia en ratones silvestres y transgénicos. La tabla muestra el promedio (\bar{x}) y la desviación estándar (S.D.) del valor máximo alcanzado en las tres réplicas de cada tiempo en función del genotipo. Exp.= experimento; dpo= días post-operación.



B)

dpo	Exp. I			Exp. II		
	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,10)	p	p(BH)
-5	0,106	0,755	0,755	-	-	-
-2	0,115	0,746	0,755	-	-	-
7	15,000	0,008	0,01*	-	-	-
14	16,154	0,007	0,01*	0,822	0,386	0,387
21	15,000	0,008	0,01*	1,483	0,251	0,387
28	15,000	0,008	0,01*	1,757	0,214	0,387
35	15,000	0,008	0,01*	1,757	0,214	0,387
42	15,000	0,008	0,01*	0,818	0,387	0,387
49	15,000	0,008	0,01*	1,227	0,294	0,387
56	15,000	0,008	0,01*	6,084	0,033	0,233

Figura R3.6. Diferencias en la recuperación motora entre ratones SPL+/- y WT (Test Rotarod). A) Las gráficas ilustran los valores promedio y la desviación estándar del tiempo de latencia máximo (en segundos) alcanzado en los distintos ensayos realizados para evaluar la recuperación motora tras la lesión medular. N=3 ratones SPL+/- y n=4 ratones WT en el Exp. I; y n=5 ratones SPL+/- y n=6 ratones WT en el Exp. II. Exp.=experimento. B) La tabla resume los resultados del análisis estadístico realizado mediante el test de Wilcoxon no paramétrico. Los datos considerados para este análisis fueron los valores máximos de cada individuo alcanzados en las tres réplicas. En la tabla se detallan el estadístico y sus grados de libertad (F(a,b)), la probabilidad de que los cambios observados entre ratones transgénicos y silvestres sean significativos (p) y la probabilidad ajustada según la corrección de múltiples comparaciones de Benjamini & Hochberg (p(BH)). El símbolo (*) indica una p(BH)<0,05, señalada para facilitar la visualización de los datos.

Por último, completamos la evaluación de la recuperación funcional motora empleando el test Versamax. En este test se realiza un estudio en campo abierto que registra automáticamente numerosos parámetros del movimiento de un animal (v.g.: tiempo total en movimiento, distancia horizontal recorrida durante el test, etc.) durante 10 minutos, dividiendo las medidas en dos bloques de 5min para detectar si existe habituación al espacio o algún cambio comportamental debido al cansancio, permitiendo una visión general más completa de su comportamiento. Es necesario mencionar que el análisis de comportamiento mediante este test fue realizado únicamente durante el Exp. I, por lo que los datos mostrados corresponden a una $n=4$ ratones silvestres y $n=3$ ratones transgénicos. Los datos obtenidos mediante el test Versamax se recogen en el material suplementario de esta sección (Sup.Mat.16; Pág. 299). Para aumentar la posibilidad de detectar mejoras comportamentales y simplificar el tratamiento de datos, decidimos analizar únicamente los valores máximos alcanzados en los dos bloques de 5min por cada animal. Para comparar entre los valores de los animales silvestres y los transgénicos en cada uno de los tiempos evaluados, empleamos el test de rangos de Wilcoxon ajustando los niveles de significación para múltiples comparaciones (Tabla R3.7). Sorprendentemente, este análisis puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas en el comportamiento entre ratones transgénicos y silvestres en los días previos a la lesión medular, aunque estas diferencias no se mantienen sistemáticamente tras el trauma. De hecho, tras la lesión no se observa ninguna diferencia comportamental entre ratones transgénicos y silvestres, atendiendo a una probabilidad ajustada del 95% ($p(BH)<0,05$). Sin considerar este ajuste, se podrían apreciar algunas discrepancias en el comportamiento, si bien resulta destacable que los cambios no se producen de manera consistente en un parámetro en concreto sino que los parámetros afectados difieren en el tiempo. La Tabla R3.8 resume el promedio de los valores máximos obtenidos para ratones SPL+/- y WT, identificando los resultados estadísticos con una $p<0,005$. Interesantemente, y aunque las diferencias no pueden considerarse consistentes, si atendemos a los cambios en la actividad vertical (en la cual se requiere funcionalidad de las extremidades traseras) antes de la lesión, los ratones transgénicos presenta menor actividad, número de movimientos y tiempo de movimiento que los ratones silvestres. No obstante, tras la lesión esta tendencia se invierte a favor de los ratones transgénicos, lo que sugiere una ligera mejoría de éstos respecto a los ratones silvestres que concuerda con los resultados obtenidos en los tests descritos previamente.

names	-5 dpo			-2 dpo			2 dpo			7 dpo			14 dpo			21 dpo			28 dpo			35 dpo			42 dpo			49 dpo			56 dpo		
	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)
HACTV	16.154	0.007	0.084	0.000	1.000	1.000	6.387	0.046	1.000	0.271	0.621	0.863	0.027	0.875	1.000	0.251	0.634	1.000	0.473	0.517	1.000	0.251	0.634	0.896	15.000	0.008	0.099	0.464	0.521	0.863	1.296	0.298	0.738
TOTDIST	0.764	0.416	0.623	16.154	0.007	0.049	0.251	0.634	1.000	0.764	0.416	0.863	0.473	0.517	0.742	0.764	0.416	0.939	3.765	0.100	0.602	0.000	1.000	1.000	0.251	0.634	1.000	0.473	0.517	0.863	0.117	0.744	0.949
MOVNO	0.110	0.751	0.788	8.953	0.024	0.097	0.764	0.416	1.000	0.108	0.753	0.863	0.000	1.000	1.000	8.953	0.024	0.291	3.889	0.096	0.602	0.027	0.876	0.955	0.455	0.525	0.970	0.764	0.416	0.863	1.755	0.233	0.738
MOVTIME	1.207	0.314	0.623	15.000	0.008	0.049	0.473	0.517	1.000	0.781	0.411	0.863	0.108	0.753	0.951	0.764	0.416	0.939	3.765	0.100	0.602	0.106	0.755	0.954	2.569	0.160	0.549	0.000	1.000	1.000	1.265	0.304	0.738
RESTIME	0.473	0.517	0.626	3.765	0.100	0.268	0.029	0.871	1.000	0.261	0.628	0.863	16.154	0.007	0.163	0.473	0.517	0.955	0.464	0.521	1.000	0.251	0.634	0.896	17.500	0.006	0.099	0.255	0.631	0.863	1.265	0.304	0.738
VACTV	5.435	0.059	0.281	9.432	0.022	0.097	-	-	-	1.429	0.277	0.863	5.714	0.054	0.163	0.000	1.000	1.000	-	-	-	5.714	0.054	0.204	-	-	-	0.167	0.697	0.863	0.714	0.430	0.738
VMOVNO	1.947	0.212	0.623	0.464	0.521	0.700	-	-	-	1.429	0.277	0.863	5.385	0.059	0.163	0.000	1.000	1.000	-	-	-	5.385	0.059	0.204	-	-	-	0.167	0.697	0.863	0.714	0.430	0.738
VTIME	0.781	0.411	0.623	0.251	0.634	0.761	-	-	-	-	-	-	5.385	0.059	0.163	0.000	1.000	1.000	-	-	-	5.385	0.059	0.204	-	-	-	1.429	0.277	0.863	0.714	0.430	0.738
STRCNT	0.464	0.521	0.626	1.180	0.319	0.547	3.765	0.100	1.000	0.473	0.517	0.863	0.251	0.634	0.846	0.493	0.509	0.955	1.265	0.304	1.000	0.251	0.634	0.896	1.755	0.233	0.700	0.117	0.744	0.863	0.764	0.416	0.738
STRNO	0.764	0.416	0.623	0.027	0.876	0.914	1.800	0.228	1.000	0.834	0.396	0.863	1.755	0.233	0.431	1.154	0.324	0.939	0.110	0.751	1.000	0.000	1.000	1.000	3.889	0.096	0.461	0.473	0.517	0.863	0.027	0.876	0.955
STRTIME	0.106	0.755	0.788	16.154	0.007	0.049	0.493	0.509	1.000	0.027	0.875	0.954	1.800	0.228	0.431	0.108	0.753	1.000	0.110	0.751	1.000	0.255	0.631	0.896	0.000	1.000	1.000	0.106	0.755	0.863	0.027	0.876	0.955
CWREV	0.027	0.875	0.875	2.569	0.160	0.360	0.714	0.430	1.000	0.115	0.746	0.863	0.000	1.000	1.000	-	-	-	0.029	0.871	1.000	0.167	0.697	0.929	0.714	0.430	0.970	0.714	0.430	0.863	0.310	0.598	0.897
CCWREV	9.432	0.022	0.146	1.265	0.304	0.547	0.310	0.598	1.000	2.887	0.140	0.863	0.834	0.396	0.679	17.500	0.006	0.139	21.000	0.004	0.090	0.271	0.621	0.896	5.279	0.061	0.368	5.279	0.061	0.736	0.115	0.746	0.949
MRTDIST	8.953	0.024	0.146	0.464	0.521	0.700	0.110	0.751	1.000	1.154	0.324	0.863	1.755	0.233	0.431	0.027	0.876	1.000	0.251	0.634	1.000	1.154	0.324	0.864	0.473	0.517	0.970	2.569	0.160	0.863	1.800	0.228	0.738
MRTTIME	0.834	0.396	0.623	16.154	0.007	0.049	0.473	0.517	1.000	0.271	0.621	0.863	3.765	0.100	0.241	5.645	0.055	0.441	0.781	0.411	1.000	0.303	0.602	0.896	0.108	0.753	1.000	2.500	0.165	0.863	0.000	1.000	1.000
CTRDIST	16.154	0.007	0.084	3.765	0.100	0.268	0.251	0.634	1.000	0.106	0.755	0.863	0.000	1.000	1.000	0.764	0.416	0.939	0.464	0.521	1.000	1.207	0.314	0.864	2.800	0.145	0.549	0.115	0.746	0.863	1.154	0.324	0.738
CTRTIME	0.473	0.517	0.626	5.645	0.055	0.189	0.115	0.746	1.000	0.106	0.755	0.863	9.432	0.022	0.163	2.569	0.160	0.939	0.455	0.525	1.000	0.455	0.525	0.896	0.115	0.746	1.000	0.781	0.411	0.863	0.464	0.521	0.834
LFTIME	1.265	0.304	0.623	2.500	0.165	0.360	0.027	0.876	1.000	0.117	0.744	0.863	0.027	0.876	1.000	0.027	0.875	1.000	0.255	0.631	1.000	0.027	0.875	0.955	0.464	0.521	0.970	0.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000
RFTIME	0.255	0.631	0.721	0.455	0.525	0.700	1.180	0.319	1.000	0.251	0.634	0.863	0.455	0.525	0.742	0.027	0.875	1.000	0.000	1.000	1.000	0.027	0.876	0.955	1.265	0.304	0.810	0.764	0.416	0.863	0.110	0.751	0.949
LRTIME	1.154	0.324	0.623	0.455	0.525	0.700	0.027	0.876	1.000	1.800	0.228	0.863	5.279	0.061	0.163	0.106	0.755	1.000	0.000	1.000	1.000	0.493	0.509	0.896	0.027	0.876	1.000	17.500	0.006	0.139	0.027	0.876	0.955
RRTIME	1.180	0.319	0.623	0.106	0.755	0.824	0.251	0.634	1.000	1.154	0.324	0.863	0.464	0.521	0.742	1.755	0.233	0.939	0.455	0.525	1.000	16.154	0.007	0.167	9.432	0.022	0.175	0.027	0.875	0.954	1.180	0.319	0.738
RACTV	2.569	0.160	0.623	1.755	0.233	0.467	-	-	-	1.429	0.277	0.863	5.385	0.059	0.163	0.000	1.000	1.000	-	-	-	5.714	0.064	0.204	-	-	-	0.167	0.697	0.863	0.714	0.430	0.738
RMOVNO	0.483	0.513	0.626	0.251	0.634	0.761	-	-	-	1.429	0.277	0.863	5.385	0.059	0.163	0.000	1.000	1.000	-	-	-	5.385	0.059	0.204	-	-	-	0.167	0.697	0.863	0.714	0.430	0.738
RTIME	1.207	0.314	0.623	0.115	0.746	0.824	-	-	-	-	-	-	5.385	0.059	0.163	0.714	0.430	0.939	-	-	-	5.385	0.059	0.204	-	-	-	1.429	0.277	0.863	0.714	0.430	0.738

Tabla R3.7. Diferencias significativas entre SPL +/- y WT (Test Versamax). La tabla resume los resultados del análisis estadístico realizado mediante el test de Wilcoxon no paramétrico. Los datos considerados para este análisis fueron los valores máximos de cada individuo alcanzados en las dos réplicas. Se encuentran detallados el estadístico y sus grados de libertad ($F(a,b)$), la probabilidad de que los cambios observados entre ratones transgénicos y silvestres sean significativos (p) y la probabilidad ajustada según la corrección de múltiples comparaciones de Benjamini & Hochberg ($p(BH)$). Para facilitar la visualización de los datos, aquellos valores con una $p < 0,05$ se encuentran destacados con sombreado mientras que en negrita se señalan aquellos con una $p(BH) < 0,05$.

dpo	Genotipo	Exp. I (Parte-I)																							
		HACTV		TOTDIST		MOVNO		MOVTIME		RESTIME		VACTV		VMOVNO		VTIME		STRCNT		STRNO		STRTIME		CWREV	
		\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.
5	WT	1414,50	303,02	691,00	206,72	66,50	9,11	79,65	27,19	278,28	18,17	103,75	23,40	39,00	9,49	31,55	10,07	779,00	245,42	52,25	6,24	77,28	22,52	3,75	2,22
	SPL +/-	843,67	100,43	332,00	58,51	51,67	4,16	35,13	1,42	289,03	3,11	63,00	26,23	22,00	4,36	21,10	5,41	363,33	63,96	41,67	7,23	38,63	9,96	2,33	2,52
2	WT	1139,00	335,57	407,75	109,83	62,50	18,95	45,83	14,58	279,03	10,84	66,75	17,00	30,25	6,80	24,05	7,56	654,25	253,16	52,25	5,97	72,33	22,59	3,50	1,29
	SPL +/-	547,67	153,64	187,00	85,08	27,00	8,54	17,23	6,81	292,50	1,51	31,00	13,11	13,33	4,73	9,63	2,97	271,33	56,04	34,33	4,51	34,20	2,03	1,33	1,53
7	WT	508,00	164,77	102,75	56,70	20,75	6,70	19,15	9,55	294,30	3,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	367,25	145,97	34,25	8,14	72,35	32,47	0,50	1,00
	SPL +/-	348,67	99,21	82,33	24,34	17,67	6,35	12,97	2,70	295,87	1,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	218,67	81,13	30,67	13,20	39,03	16,79	0,00	0,00
14	WT	401,00	61,94	103,00	45,09	21,00	12,06	15,90	7,77	293,15	1,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	225,50	46,88	36,25	2,06	36,73	6,43	0,75	0,50
	SPL +/-	558,67	184,80	107,67	61,81	23,00	18,19	13,13	6,85	287,20	7,15	0,33	0,58	0,33	0,58	0,00	0,00	346,00	99,74	44,00	5,29	55,53	13,30	0,33	0,58
21	WT	440,50	157,57	115,75	47,68	25,25	7,14	17,53	7,64	289,00	6,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	270,00	137,76	30,00	6,48	43,23	17,40	0,50	0,58
	SPL +/-	389,33	199,38	97,33	52,29	21,00	14,18	12,07	7,58	294,53	2,72	9,33	8,62	1,67	1,53	1,13	1,10	218,00	135,23	34,33	13,58	27,30	14,55	0,67	1,15
28	WT	395,75	127,87	109,00	97,87	18,00	11,52	14,83	14,34	293,03	6,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	210,25	101,98	30,00	12,14	30,53	16,40	0,75	0,96
	SPL +/-	364,67	71,28	67,33	9,50	19,33	6,66	9,17	0,46	297,17	2,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	201,67	63,63	36,00	8,54	38,13	15,50	0,67	0,58
35	WT	413,25	156,27	114,50	54,02	21,25	12,79	16,63	8,02	287,13	8,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	250,50	109,04	31,25	7,18	40,88	10,29	0,25	0,50
	SPL +/-	301,33	17,01	55,00	44,84	13,33	7,57	8,50	6,24	297,23	1,21	7,00	9,64	3,00	4,36	1,00	1,56	196,00	28,62	28,00	9,17	37,23	18,79	0,33	0,58
42	WT	392,75	169,69	117,50	56,42	24,00	13,39	18,23	8,01	288,38	8,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	225,50	108,75	31,50	12,87	34,93	25,58	0,50	1,00
	SPL +/-	211,00	118,90	29,33	17,01	6,67	4,16	4,93	3,26	299,17	1,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	123,00	74,32	21,33	6,51	26,03	18,60	0,00	0,00
49	WT	318,00	187,90	95,00	41,01	16,75	11,44	14,63	5,51	291,95	3,30	0,25	0,50	0,25	0,50	0,00	0,00	179,50	108,93	29,75	15,22	26,30	17,30	0,25	0,50
	SPL +/-	280,00	286,06	67,33	95,00	14,00	20,88	9,70	11,99	298,37	2,83	1,00	1,73	0,67	1,15	0,37	0,64	133,00	123,96	21,33	14,43	20,70	18,55	0,33	0,58
56	WT	317,25	143,97	70,25	67,31	14,00	12,57	8,93	8,17	298,38	2,29	0,25	0,50	0,25	0,50	0,03	0,05	148,25	71,32	29,25	12,50	26,40	14,07	0,50	1,00
	SPL +/-	332,00	77,95	94,67	25,01	21,00	9,54	15,17	6,02	290,77	6,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	219,33	49,14	30,67	10,21	31,20	6,25	0,67	0,58

Tabla R3.8. Promedio de los valores registrados en ratones silvestres y transgénicos en el test Versamax (continua en la página siguiente). La tabla muestra el promedio (\bar{X}) y desviación estándar (S.D.) del valor máximo alcanzado en cada parámetro en las dos réplicas de cada tiempo, diferenciadas en función del genotipo. Las casillas sombreadas destacan los valores con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) según el test de Wilcoxon. Cada par de columnas verticales y S.D. corresponden a cada uno de los parámetros analizados en el test (el nombre de los parámetros correspondiente a cada abreviatura y una sucinta explicación están recogidos en el apartado de material y métodos). Exp. = experimento; dpo = días post-operación.

		Exp. I (Parte-I)																							
Genotipo	dp	HACTV		TOTDIST		MOVNO		MOVTIME		RESTIME		VACTV		VMOVNO		VTIME		STRCNT		STRNO		STRTIME		CWREV	
		\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.	\bar{x}	S.D.
WT	5	1414,50	303,02	691,00	206,72	66,50	9,11	79,65	27,19	278,28	18,17	103,75	23,40	39,00	9,49	31,55	10,07	779,00	245,42	52,25	6,24	77,28	22,52	3,75	2,22
SPL +/-	5	843,67	100,43	332,00	58,51	51,67	4,16	35,13	1,42	289,03	3,11	63,00	26,23	22,00	4,36	21,10	5,41	363,33	63,96	41,67	7,23	38,63	9,96	2,33	2,52
WT	12	1139,00	335,57	407,75	109,83	62,50	18,95	45,83	14,58	279,03	10,84	66,75	17,00	30,25	6,80	24,05	7,56	654,25	253,16	52,25	5,97	72,33	22,59	3,50	1,29
SPL +/-	12	547,67	153,64	187,00	85,08	27,00	8,54	17,23	6,81	292,50	1,51	31,00	13,11	13,33	4,73	9,63	2,97	271,33	56,04	34,33	4,51	34,20	2,03	1,33	1,53
WT	2	508,00	164,77	102,75	56,70	20,75	6,70	19,15	9,55	294,30	3,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	367,25	145,97	34,25	8,14	72,35	32,47	0,50	1,00
SPL +/-	2	348,67	99,21	82,33	24,34	17,67	6,35	12,97	2,70	295,87	1,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	218,67	81,13	30,67	13,20	39,03	16,79	0,00	0,00
WT	7	401,00	61,94	103,00	45,09	21,00	12,06	15,90	7,77	293,15	1,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	225,50	46,88	36,25	2,06	36,73	6,43	0,75	0,50
SPL +/-	7	538,67	184,80	107,67	61,81	23,00	18,19	13,13	6,85	287,20	7,15	0,33	0,58	0,33	0,58	0,00	0,00	346,00	99,74	44,00	5,29	55,53	13,30	0,33	0,58
WT	14	440,50	157,57	115,75	47,68	25,25	7,14	17,53	7,64	289,00	6,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	270,00	137,76	30,00	6,48	43,23	17,40	0,50	0,58
SPL +/-	14	389,33	199,38	97,33	52,29	21,00	14,18	12,07	7,58	294,53	2,72	9,33	8,62	1,67	1,53	1,13	1,10	218,00	135,23	34,33	13,58	27,30	14,55	0,67	1,15
WT	21	335,25	138,07	105,50	82,27	15,75	7,32	15,68	11,26	292,95	4,74	0,75	1,50	0,25	0,50	0,08	0,15	181,50	69,18	30,75	8,34	35,03	22,64	0,00	0,00
SPL +/-	21	351,67	124,58	79,33	40,38	18,33	10,07	9,70	3,61	297,93	2,21	0,33	0,58	0,33	0,58	0,00	0,00	208,00	102,21	32,67	8,08	33,47	10,64	0,00	0,00
WT	28	395,75	127,87	109,00	97,87	18,00	11,52	14,83	14,34	293,03	6,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	210,25	101,98	30,00	12,14	30,53	16,40	0,75	0,96
SPL +/-	28	364,67	71,28	67,33	9,50	19,33	6,66	9,17	0,46	297,17	2,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	201,67	63,63	36,00	8,54	38,13	15,50	0,67	0,58
WT	35	413,25	156,27	114,50	54,02	21,25	12,79	16,63	8,02	287,13	8,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	250,50	109,04	31,25	7,18	40,88	10,29	0,25	0,50
SPL +/-	35	301,33	17,01	55,00	44,84	13,33	7,57	8,50	6,24	297,23	1,21	7,00	9,64	3,00	4,36	1,00	1,56	196,00	28,62	28,00	9,17	37,23	18,79	0,33	0,58
WT	42	392,75	169,69	117,50	56,42	24,00	13,39	18,23	8,01	288,38	8,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	225,50	108,75	31,50	12,87	34,93	25,58	0,50	1,00
SPL +/-	42	211,00	118,90	29,33	17,01	6,67	4,16	4,93	3,26	299,17	1,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	123,00	74,32	21,33	6,51	26,03	18,60	0,00	0,00
WT	49	318,00	187,90	95,00	41,01	16,75	11,44	14,63	5,51	291,95	3,30	0,25	0,50	0,25	0,50	0,00	0,00	179,50	108,93	29,75	15,22	26,30	17,30	0,25	0,50
SPL +/-	49	280,00	286,06	67,33	95,00	14,00	20,88	9,70	11,99	298,37	2,83	1,00	1,73	0,67	1,15	0,37	0,64	133,00	123,96	21,33	14,43	20,70	18,55	0,33	0,58
WT	56	317,25	143,97	70,25	67,31	14,00	12,57	8,93	8,17	298,38	2,29	0,25	0,50	0,25	0,50	0,03	0,05	148,25	71,32	29,25	12,50	26,40	14,07	0,50	1,00
SPL +/-	56	352,00	77,95	94,67	25,01	21,00	9,54	15,17	6,02	290,77	6,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	219,33	49,14	30,67	10,21	31,20	6,25	0,67	0,58

Tabla R3.8 (continuación). Promedio de los valores registrados en ratones silvestres y transgénicos en el test Versamax.

Análisis de la función sensitiva

Además de las evaluaciones de la función motora, realizamos tests específicos para analizar la función sensitiva frente a estímulos mecánicos y térmicos (calor y frío). Estos test fueron empleados únicamente en el Exp. I, por lo que los datos mostrados corresponden a una n=4 ratones silvestres y n=3 ratones transgénicos.

Para evaluar la respuesta sensitiva frente a estímulos mecánicos empleamos el test de Von Frey. Este test evalúa la sensibilidad de los animales mediante la aplicación de filamentos flexibles de distinto grosor que permiten ejercer una fuerza definida sobre la zona palmar de las extremidades. Estos filamentos se aplican siguiendo el método “up and down” propuesto por Dixon (1980) para estimar el umbral de estimulación mecánica que induce una respuesta. En el apartado correspondiente de materiales y métodos se describe en detalle la metodología empleada para realizar este test. Los datos obtenidos mediante este test se detallan en la Tabla R3.9.

Exp. I (Parte I)													
				Último vF		Rango aplicado		Parámetros					
	Genotipo	Animal	Patrón	gramos	M (=Xt)	vF Inicio	vF Final	δ	k	Xt + kδ	PTW(50%)	̄X	S.D.
-5 dpo	WT	A	00011010	0,4	3,61	0,16	1	0,29	0,95	3,88	0,76	0,74	0,42
		B	00010011	1	4,08	0,16	1,4	0,24	-0,14	4,05	1,11		
		C	00010110	0,4	3,61	0,16	1	0,29	1,25	3,97	0,93		
		D	0010011	0,16	3,22	0,16	1	0,29	-0,14	3,18	0,15		
	SPL+/-	E	0010101	0,6	3,84	0,16	0,6	0,31	-0,46	3,70	0,50	0,55	0,32
		F	00010101	1	4,08	0,16	1	0,29	-0,45	3,95	0,89		
		G	010101	0,4	3,61	0,16	0,4	0,39	-0,50	3,42	0,26		
-2dpo	WT	A	100111	0,07	2,83	0,07	0,6	0,34	0,30	2,93	0,09	0,60	0,39
		B	010010	0,4	3,61	0,16	0,6	0,31	0,37	3,73	0,53		
		C	00011010	0,4	3,61	0,16	0,6	0,31	0,95	3,91	0,80		
		D	0011000	1	4,08	0,07	1	0,31	-0,27	4,00	0,99		
	SPL+/-	E	00010100	1	4,08	0,16	1	0,29	0,04	4,09	1,23	0,82	0,44
		F	100110	0,4	3,61	0,07	0,4	0,39	0,83	3,93	0,86		
		G	010011	0,4	3,61	0,16	0,6	0,31	-0,17	3,56	0,36		
7 dpo	WT	A	00010100	1	4,08	0,16	1,4	0,24	0,04	4,09	1,23	0,97	0,56
		B	0001000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-0,15	4,13	1,36		
		C	0011010	0,16	3,22	0,16	0,6	0,31	0,94	3,51	0,32		
		D	Sin soporte de peso										
	SPL+/-	E	00010100	1	4,08	0,16	1,4	0,24	0,04	4,09	1,23	1,58	0,31
		F	0000100	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	0,32	4,24	1,76		
		G	0000100	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	0,32	4,24	1,76		
14 dpo	WT	A	000101001	1	4,08	0,16	1,4	0,24	0,04	4,09	1,23	1,10	0,26
		B	0001000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-0,15	4,13	1,36		
		C	00011000	1	4,08	0,16	1,4	0,24	-0,26	4,02	1,04		
		D	000010110	0,6	3,84	0,16	1,4	0,24	0,18	3,88	0,76		
	SPL+/-	E	100110	0,07	2,83	0,07	0,4	0,39	0,83	3,15	0,14	0,96	0,95
		F	0010001	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-1,25	3,87	0,75		
		G	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
21 dpo	WT	A	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00	1,71	0,58
		B	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		C	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		D	010000	1	4,08	0,16	1	0,29	-0,55	3,92	0,84		
	SPL+/-	E	0000100	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	0,32	4,24	1,76	1,92	0,14
		F	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		G	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		

Pie de figura en la página siguiente.

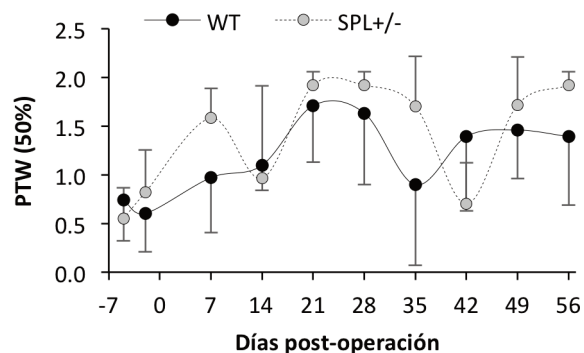
Exp. I (Parte II)													
				Último vF		Rango aplicado		Parámetros					
	Genotipo	Animal	Patrón	gramos	M (=Xt)	vF Inicio	vF Final	δ	k	Xt + kδ	PTW(50%)	̄X	S.D.
28 dpo	WT	A	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00	1,63	0,73
		B	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		C	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		D	010010	0,4	3,61	0,16	0,6	0,31	0,37	3,73	0,53		
	SPL+/-	E	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00	1,92	0,14
		F	0000100	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	0,32	4,24	1,76		
		G	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
35 dpo	WT	A	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00	0,90	0,83
		B	010000	1	4,08	0,16	1	0,29	-0,55	3,92	0,84		
		C	0010001	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-1,25	3,87	0,75		
		D	1111	0,02	2,36	0,02	0,16	0,29	-	-	0,00		
	SPL+/-	E	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00	1,70	0,51
		F	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		G	00010011	1	4,08	0,16	1,4	0,24	-0,14	4,05	1,11		
42 dpo	WT	A	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00	1,39	0,76
		B	000010101	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-0,45	4,06	1,15		
		C	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		D	010100	0,4	3,61	0,16	0,4	0,39	0,02	3,62	0,42		
	SPL+/-	E	0010001	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-1,25	3,87	0,75	0,70	0,42
		F	0010000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-0,55	4,04	1,10		
		G	010101	0,4	3,61	0,16	0,4	0,39	-0,50	3,42	0,26		
49 dpo	WT	A	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00	1,46	0,50
		B	0000100	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	0,32	4,24	1,76		
		C	000011001	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-0,75	3,99	0,98		
		D	0010000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-0,55	4,04	1,10		
	SPL+/-	E	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00	1,72	0,49
		F	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		G	000010101	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-0,45	4,06	1,15		
56 dpo	WT	A	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00	1,39	0,70
		B	010000	1	4,08	0,16	1	0,29	-0,55	3,92	0,84		
		C	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		D	00011001	1	4,08	0,16	1	0,29	-0,75	3,86	0,73		
	SPL+/-	E	0000100	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	0,32	4,24	1,76	1,92	0,14
		F	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		
		G	00000	1,4	4,17	0,16	1,4	0,24	-	-	2,00		

Tabla R3.9 (Continuación). Tabla de datos del Test de Von Frey. En la tabla se detallan los valores de los parámetros necesarios para estimar el umbral de sensibilidad mecánica al 50% (PWT 50%) para cada animal y día post-LME. Estos parámetros consisten en: los patrones de sensibilidad obtenidos y el parámetro "k" derivado del patrón según las tablas descritas por (Dixon, 1980); el valor del último filamento empleado en el patrón (expresada en gramos) y su correspondiente valor de fuerza tabulado (M, expresado en unidades logarítmicas y correspondiente al término "Xt" de la ecuación PTW 50%); el rango de filamentos empleado en cada día de evaluación para cada animal y el parámetro "δ" calculado como el promedio de las diferencias entre las fuerzas de los filamentos en dicho rango. De acuerdo con el método de up & down, el umbral de sensibilidad al 50% se calcula según la ecuación: $PTW\ 50\% = (10[Xt + k\delta])/10000$. La tabla también muestra el promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (S.D.) del umbral de sensibilidad para cada tiempo post-operación, en función del genotipo. El umbral de sensibilidad al 50% para aquellos ratones sin respuesta ante ningún filamento, fue considerado como "2", mientras que en el caso de presentar sensibilidad ante todos los filamentos, el umbral considerado fue "0,001". Los valores "2" y "0,001" se eligieron arbitrariamente considerando como único requisito que estuviesen, respectivamente, por encima y por debajo del rango en estudio.

En muchos de los casos, los ratones no presentaron respuesta en el rango de los ocho filamentos pre-establecidos al inicio del ensayo (0,02-1,4g), imposibilitando la generación de un patrón que permita establecer el umbral de sensibilidad (Chaplan *et al.*, 1994; Dixon, 1980). En estos casos, el umbral de sensibilidad fue estipulado como “2”. En el extremo opuesto, algunos ratones mostraron respuestas positivas frente a todos los filamentos testados imposibilitando, igualmente, establecer el umbral de sensibilidad, por lo que decidimos estipular un umbral de sensibilidad de valor “0,001”. Los valores “2” y “0,001” se eligieron arbitrariamente considerando como único requisito que estuviesen, respectivamente, por encima y por debajo del rango en estudio. Los promedios de los umbrales de sensibilidad a lo largo del tiempo en ratones transgénicos y silvestres (Figura R3.7.A) parecen indicar que los ratones transgénicos tienen menor sensibilidad a estímulos mecánicos que los ratones silvestres (mayor grosor de filamento implica mayor presión y, por tanto, menor sensibilidad). Estas diferencias son especialmente manifiestas a partir de la tercera semana tras el trauma (21dpo), exceptuando a 42dpo cuando se observa lo contrario. Para evaluar si estas diferencias pueden considerarse significativas, empleamos el test no paramétrico de Wilcoxon considerando los valores de PTW50% como variable dependiente y el genotipo y los días tras la LME como factores. Es importante mencionar que el uso de un test no paramétrico elimina cualquier efecto de la tabulación de los valores “2” y “0,001”, ya que se basa en el orden de los valores (de mayor a menor) sin considerar los valores de cada medida. El análisis estadístico de los datos no revela diferencias significativas en la sensibilidad frente a estímulos mecánicos entre los ratones transgénicos y los silvestres (Figura R3.7.B).

Figura R3.7. Diferencias de sensibilidad frente a estímulos mecánicos (Test de Von Frey) entre ratones SPL+/- y WT. A) Las gráficas ilustran los valores promedio y la desviación estándar de los valores umbrales de sensibilidad (PTW 50%), antes y después de la lesión medular. B) La tabla resume los resultados del análisis estadístico realizado mediante el test de Wilcoxon no paramétrico. En ella se detallan el estadístico y sus grados de libertad ($F(a,b)$), la probabilidad de que los cambios observados entre ratones transgénicos y silvestres sean significativos (p) y la probabilidad ajustada según la corrección de múltiples comparaciones de Benjamini & Hochberg ($p(BH)$). $N=3$ ratones SPL+/- y $n=4$ ratones WT.

A) Test de Von Frey



B)

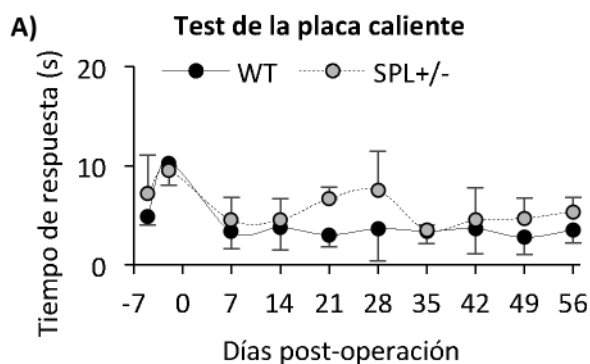
dpo	Exp. I		
	F(1,6)	p	p(BH)
-5	0,455	0,525	0,750
-2	0,455	0,525	0,750
7	0,255	0,631	0,789
14	0,455	0,525	0,75
21	0,000	1,000	1,000
28	0,000	1,000	1,000
35	2,800	0,145	0,750
42	2,569	0,160	0,750
49	1,265	0,304	0,750
56	0,565	0,481	0,750

Completamos la evaluación sensitiva realizando test específicos evaluar las respuestas frente a estímulos térmicos (calor y frío). En primer lugar, evaluamos la sensibilidad frente a calor empleando el test de placa caliente (*hot plate*). Este test evalúa el tiempo de respuesta de los animales al contacto con una placa metálica a una temperatura constante de +52°C. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla R3.10. Para facilitar el manejo de datos, empleamos el promedio de las dos réplicas (duplicados) realizados en cada evaluación. Los resultados obtenidos muestran un comportamiento similar en los ratones transgénicos y los silvestres, tanto antes como a tiempos tempranos tras la LME (Figura R3.8.A). Sin embargo, existen algunas diferencias hacia el ecuador del tiempo de estudio (21 y 28dpo), que se revierten en las siguientes semanas (35 y 42dpo) y reaparecen de manera más sutil hacia el final del ensayo (49 y 56dpo). De acuerdo con el test no paramétrico de Wilcoxon empleado en el presente estudio, solo las diferencias registradas en la tercera semana tras la LME son significativas, momento en el que el tiempo de respuesta de los ratones transgénicos es mayor que el de los ratones silvestres, indicando una menor sensibilidad frente al calor (Figura R3.8.B).

Exp. I															
	Genotipo	Animal	Réplica 1	Réplica 2	\bar{X}_a	\bar{X}_g	S.D.		Genotipo	Animal	Réplica 1	Réplica 2	\bar{X}_a	\bar{X}_g	S.D.
-5 dpo	WT	A	4	4	4	4,88	0,85	28 dpo	WT	A	2	3	2,5	3,63	3,28
		B	5	7	6					B	1	2	1,5		
		C	5	5	5					C	10	7	8,5		
	SPL+/-	D	3	6	4,5	7,17	3,88		SPL+/-	D	2	2	2	7,50	3,97
		E	15	8	11,5					E	3	6	4,5		
		F	5	7	6					F	4	8	6		
G	3	5	4	G	4	20	12								
-2 dpo	WT	A	8	7	7,5	10,25	2,25	35 dpo	WT	A	3	4	3,5	3,38	1,25
		B	4	16	10					B	3	7	5		
		C	9	12	10,5					C	1	3	2		
	SPL+/-	D	15	11	13	9,50	0,50		SPL+/-	D	2	4	3	3,50	0,50
		E	5	15	10					E	3	3	3		
		F	8	10	9					F	2	5	3,5		
G	11	8	9,5	G	4	4	4								
7 dpo	WT	A	4	3	3,5	3,33	1,76	42 dpo	WT	A	8	5	6,5	3,63	2,53
		B	2	1	1,5					B	6	4	5		
		C	2	8	5					C	1	2	1,5		
	SPL+/-	D	-	-	-	4,50	2,29		SPL+/-	D	1	2	1,5	4,50	3,28
		E	2	3	2,5					E	1	1	1		
		F	2	6	4					F	11	4	7,5		
G	2	12	7	G	2	8	5								
14 dpo	WT	A	10	3	6,5	3,75	2,25	49 dpo	WT	A	3	6	4,5	2,75	1,76
		B	1	1	1					B	4	4	4		
		C	2	5	3,5					C	1	1	1		
	SPL+/-	D	2	6	4	4,50	2,18		SPL+/-	D	1	2	1,5	4,67	2,08
		E	3	3	3					E	3	5	4		
		F	5	9	7					F	7	7	7		
G	2	5	3,5	G	2	4	3								
21 dpo	WT	A	2	6	4	3,00	1,22	56 dpo	WT	A	3	5	4	3,50	1,29
		B	1	2	1,5					B	4	2	3		
		C	3	5	4					C	1	3	2		
	SPL+/-	D	2	3	2,5	6,67	1,15		SPL+/-	D	2	8	5	5,33	1,44
		E	6	6	6					E	3	11	7		
		F	4	8	6					F	2	7	4,5		
G	11	5	8	G	4	5	4,5								

Tabla R3.10. Tiempo de respuesta alcanzado por los ratones transgénicos y silvestres en el test de placa caliente. La tabla muestra el tiempo de respuesta alcanzado por los ratones en dos réplicas realizadas durante la evaluación, con un margen aproximado de 15 minutos entre ellas. Las letras A-G corresponden a los animales evaluados. Exp.= experimento; dpo= días post-operación. La columna " \bar{X}_a " refleja la media de las dos replicaciones de cada animal en cada ensayo, mientras que las columnas " \bar{X}_g " y "S.D." indican el promedio y la desviación estándar, respectivamente, de los valores de los animales según su genotipo.

Para evaluar la sensibilidad frente a frío empleamos el test de la acetona. Brevemente, este test mide el tiempo de respuesta de los animales al contacto con una gota de acetona que, al evaporarse a temperatura ambiente (aprox. 20°C; N° ICSC: 0087¹⁵), crea una sensación de frío en la zona de aplicación. Los datos obtenidos mediante este test se resumen en la Tabla R3.11. Como se aprecia en la Figura R3.9.A, en general, los ratones SPL+/- responden de manera más rápida y consistente que los silvestres, para los que, además, la sensibilidad varía disminuyendo y aumentando alternativamente hasta la séptima semana tras la LME. Sin embargo, de acuerdo con el test no paramétrico de Wilcoxon, no existen diferencias significativas ($p(BH) < 0,05$) en la sensibilidad frente a estímulos de frío tras la LME entre los ratones transgénicos y los silvestres (Figura R3.9.B) A 7dpo se observan una diferencia significativa aunque corresponde únicamente a la probabilidad no corregida ($p < 0,05$), mientras que la probabilidad ajustada se aleja bastante de la significación, por lo que esta diferencia no puede considerarse robusta.



B)

Exp. I			
dpo	F(1,6)	p	p(BH)
-5	0,473	0,517	0,862
-2	0,764	0,416	0,831
7	0,000	1,000	1,000
14	0,027	0,876	0,973
21	17,500	0,006	0,058
28	2,500	0,165	0,550
35	0,110	0,751	0,973
42	0,027	0,875	0,973
49	0,764	0,416	0,831
56	2,569	0,160	0,550

Figura R3.8. Diferencias de sensibilidad frente a estímulos térmicos entre ratones SPL+/- y WT (Test de placa caliente). A) La gráfica ilustra el promedio y la desviación estándar del tiempo de respuesta alcanzado durante la evaluación. N=3 ratones SPL+/- y n=4 ratones WT. B) La tabla resume los resultados del análisis estadístico realizado mediante el test no paramétrico de Wilcoxon. Se encuentran detallados el estadístico y sus grados de libertad ($F(a,b)$), la probabilidad de que los cambios observados entre ratones transgénicos y silvestres sean significativos (p) y la probabilidad ajustada según la corrección de múltiples comparaciones de Benjamini & Hochberg ($p(BH)$). La letra en "negrita" indica una probabilidad significativa al 95% ($p(BH) < 0,05$). Los datos considerados para en la gráfica y el análisis estadístico fueron los valores promedio de cada individuo alcanzados en las dos réplicas realizadas durante la evaluación. N=3 ratones SPL+/- y n=4 ratones WT.

¹⁵Código identificativo de la Ficha Internacional de Seguridad Química de la acetona.

Exp. I											
	Genotipo	Animal	Tiempo (s)	\bar{X}	S.D.		Genotipo	Animal	Tiempo (s)	\bar{X}	S.D.
-5 dpo	WT	A	5	9,75	5,91	28 dpo	WT	A	10	6,00	5,66
		B	10					B	-		
		C	18					C	2		
		D	6					D	-		
	SPL+/-	E	8	6,33	2,08		SPL+/-	E	2	2,33	0,58
		F	7					F	3		
	G	4		G	2						
-2 dpo	WT	A	30	11,75	12,55	35 dpo	WT	A	3	2,00	1,00
		B	10					B	-		
		C	4					C	2		
		D	3					D	1		
	SPL+/-	E	-	5,00	0,00		SPL+/-	E	1	1,67	1,15
		F	5					F	1		
	G	5		G	3						
7 dpo	WT	A	6	5,50	0,71	42 dpo	WT	A	1	3,75	2,99
		B	-					B	3		
		C	5					C	3		
		D	-					D	8		
	SPL+/-	E	5	2,33	2,31		SPL+/-	E	1	1,00	0,00
		F	1					F	1		
	G	1		G	1						
14 dpo	WT	A	1	9,25	13,96	49 dpo	WT	A	1	2,75	1,71
		B	30					B	3		
		C	5					C	5		
		D	1					D	2		
	SPL+/-	E	2	2,00	1,00		SPL+/-	E	1	1,67	0,58
		F	3					F	2		
	G	1		G	2						
21 dpo	WT	A	1	3,00	2,16	56 dpo	WT	A	1	1,75	0,96
		B	6					B	1		
		C	3					C	3		
		D	2					D	2		
	SPL+/-	E	2	1,67	0,58		SPL+/-	E	2	1,67	0,58
		F	1					F	1		
	G	2		G	2						

Tabla R3.11. Tiempo de respuesta alcanzado por los ratones transgénicos y silvestres en el test de la acetona. La tabla muestra los tiempos de respuesta alcanzados individualmente por los ratones tras la estimulación con acetona, así como el promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (S.D.) en función del genotipo. Las letras A-G corresponden a los animales evaluados. Exp.= experimento; dpo= días post-operación.

La Tabla R3.12 resume los resultados obtenidos en los diferentes test empleados para la evaluación comportamental. Como se puede apreciar, los resultados de los análisis realizados en esta sección indican que, en el primer experimento, los ratones deficientes en *Sgpl1* presentan una recuperación de la función motora significativamente mayor que los ratones silvestres. Sin embargo, en el segundo experimento no se observaron evidencias que respalden la indudable mejoría en la función motora sugerida en el primer ensayo. Respecto a la función sensitiva, nuestros resultados no revelan si la deficiencia génica de *Sgpl1* afecta a la sensibilidad frente a estímulos mecánicos o térmicos.

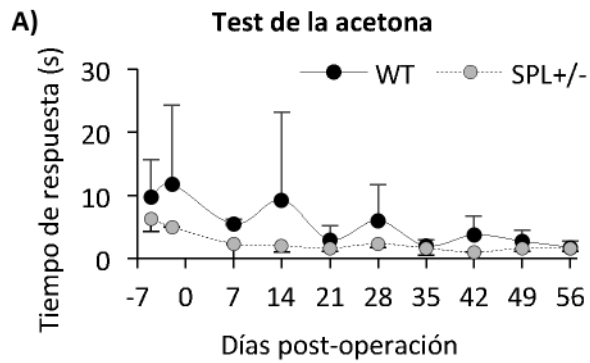


Figura R3.9. Diferencias de sensibilidad frente a estímulos de frío entre ratones SPL+/- y WT (Test de la acetona). A) Las gráficas ilustran los valores promedio y la desviación estándar del tiempo de respuesta ante el estímulo de frío a diferentes días post-lesión. B) La tabla resume los resultados del test no paramétrico de Wilcoxon. En ella se detallan el estadístico y sus grados de libertad ($F(a,b)$), la probabilidad de que los cambios observados entre ratones transgénicos y silvestres sean significativos (p) y la probabilidad ajustada según la corrección de múltiples comparaciones de Benjamini & Hochberg ($p(BH)$). El texto en "negrita" indica una probabilidad sin corregir significativa al 95% ($p < 0,05$). $n=3$ ratones SPL+/- y $n=4$ ratones WT.

B)

Exp. I			
dpo	$F(1,6)$	p	$p(BH)$
-5	0,455	0,525	0,657
-2	0,464	0,521	0,657
7	9,432	0,022	0,219
14	0,115	0,746	0,829
21	0,834	0,396	0,657
28	2,800	0,145	0,484
35	0,834	0,396	0,657
42	5,526	0,057	0,285
49	0,834	0,396	0,657
56	0,000	1,000	1,000

Test			Exp. I	Exp. II
Función motora	BMS	Score	$P(BH) < 0,05$ únicamente a 2dpo	No hay diferencias significativas
		SubScore	$p(BH) < 0,05$ en todos los tiempos post-LME (a excepción de 28dpo)	No hay diferencias significativas
		Coordinación	Los ratones SPL+/- tienen un 50% de probabilidad de coordinar a partir de la quinta semana mientras que los ratones WT no alcanzan esta probabilidad ni a la octava semana.	
	Rotarod		$p(BH) < 0,05$ en todos los tiempos post-LME (sin excepciones)	No hay diferencias significativas
	Versamax		Existen algunas diferencias tras la LME pero no son consistentes	-
Función sensitiva	Von Frey		No hay diferencias significativas	-
	Placa caliente		No hay diferencias significativas	-
	Acetona		No hay diferencias significativas	-

Tabla R3.12. Resumen de las diferencias funcionales entre ratones transgénicos y silvestres. La tabla resume las diferencias significativas entre ratones SPL+/- y ratones WT identificadas durante la evaluación comportamental llevada a cabo en la presente sección.

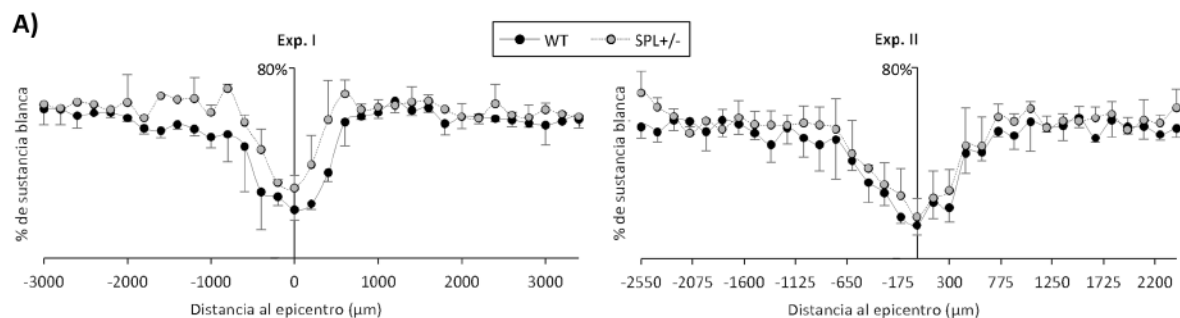
Análisis histológicos

Análisis de la preservación tisular

Con el objetivo de realizar una evaluación más exhaustiva de los efectos de la inhibición genética parcial de SPL, decidimos complementar los estudios funcionales con el análisis de la preservación de sustancia blanca y la cuantificación de diferentes poblaciones celulares de la médula espinal y comprobar así si las mejoras funcionales observadas (o su ausencia) podrían relacionarse con una mayor preservación tisular y celular.

Realizamos el análisis de la preservación tisular empleando la tinción con eriocromo-cianina, que permite identificar la sustancia blanca presente en la médula espinal. Para estimar el valor del área de sustancia blanca y el área total de la sección medular, llevamos a cabo técnicas estereológicas, empleando una malla de conteo insesgada. Los datos obtenidos en este análisis se muestran en el material suplementario de esta sección (Sup.Mat.17 y 18; Pág. 302) y de manera resumida en la Tabla R3.13. Al examinar las muestras de tejido de los animales empleados en el primer experimento se observa que el porcentaje de sustancia blanca preservada, tanto en el epicentro de la lesión como en las regiones adyacentes, es claramente mayor en ratones transgénicos que en ratones silvestres (Figura R.10.A.Exp.I). Por el contrario, en el segundo experimento, no se aprecian diferencias tan notables, a pesar de que el porcentaje de sustancia blanca preservada es ligeramente mayor de forma consistente en los ratones SPL+/- que en ratones WT (Tabla R3.13). Para evaluar la significación estadística de estas diferencias aplicamos el test no paramétrico de Wilcoxon en cada una de las distancias al epicentro evaluadas, considerando como variable dependiente el porcentaje de sustancia blanca y como factor el genotipo. Debido a la ausencia de datos representativos en gran parte de las distancias al epicentro evaluadas y para aumentar la potencia estadística del test (nótese que la probabilidad ajustada depende del número de comparaciones), decidimos limitar los análisis únicamente a aquellas regiones con valores de al menos dos individuos por genotipo. Los datos considerados, tanto para el análisis del primer ensayo como del segundo, se encuentran detallados en la Tabla Sup.Mat. 18 (Pág. 303) del material suplementario. Los resultados obtenidos confirman que, en el primer experimento, la preservación tisular en ratones transgénicos es significativamente mayor que en ratones silvestres, especialmente en la región rostral y en las regiones más próximas al epicentro del daño medular (Figura R.10.B). Por el contrario, en el segundo experimento (Figura R.10.A.Exp.II), no se observan cambios significativos en la preservación tisular ya que, a pesar de que el análisis estadístico revela una probabilidad sin ajustar significativa a $-150\mu\text{m}$, la probabilidad ajustada según Benjamini y Hochberg (1995) se aleja notablemente de la significación ($p(\text{BH}) > 0,5$).

Figura R3.10. Diferencias en el porcentaje de sustancia blanca conservada a 56dpo entre ratones transgénicos y ratones silvestres (pagina opuesta). A) Las gráficas ilustran los valores promedio y la desviación estándar del porcentaje de sustancia blanca preservada en las secciones medulares analizadas, atendiendo a la distancia respecto al epicentro de la lesión y al genotipo de los animales. $n=3$ ratones SPL+/- y $n=4$ ratones WT para el Exp. I; y $n=5$ ratones SPL+/- y $n=6$ ratones WT para el Exp. II. Exp.=experimento. B) La tabla resume los resultados del test no paramétrico de Wilcoxon, detallando el estadístico y sus grados de libertad ($F(a,b)$), la probabilidad de que los cambios observados entre ratones transgénicos y silvestres sean significativos (p) y la probabilidad ajustada según la corrección de múltiples comparaciones de Benjamini & Hochberg ($p(\text{BH})$). Las secciones con diferencias significativas, $p(\text{BH}) < 0,05$ o $p < 0,05$, están señaladas con el símbolo (*) y tipografía "negrita", respectivamente para facilitar su identificación. La sección correspondiente al epicentro se encuentra señalada con sombreado gris. $n=3$ ind/genotipo para el exp. I y $n=5$ ind/genotipo para el exp. II. Exp.= experimento.



B)

Exp. I				Exp. II			
Distancia (μm)	F(1,5)	p	p(BH)	Distancia (μm)	F(1,9)	p	p(BH)
-2000	0,038	0,852	0,852	-2550	4,313	0,068	0,572
-1200	13,500	0,014	0,043*	-2400	2,061	0,185	0,572
-1000	13,500	0,014	0,043*	-2250	2,061	0,185	0,572
-800	13,500	0,014	0,043*	-2100	0,010	0,924	0,924
-600	1,250	0,314	0,472	-1950	2,061	0,185	0,572
-400	1,250	0,314	0,472	-1800	0,871	0,375	0,708
-200	13,500	0,014	0,043*	-1650	0,250	0,629	0,764
0	13,500	0,014	0,043*	-1500	1,111	0,319	0,708
200	13,500	0,014	0,043*	-1350	0,250	0,629	0,764
400	13,500	0,014	0,043*	-1200	0,010	0,923	0,924
600	3,500	0,120	0,289	-1050	0,871	0,375	0,708
800	3,500	0,120	0,289	-900	0,250	0,629	0,764
1000	1,250	0,314	0,472	-750	0,250	0,629	0,764
1200	0,038	0,852	0,852	-600	0,250	0,629	0,764
1400	0,375	0,567	0,716	-450	4,313	0,068	0,572
1600	1,250	0,314	0,472	-300	0,505	0,495	0,764
1800	13,500	0,014	0,043*	-150	6,224	0,034	0,572
2000	0,038	0,852	0,852	0	1,111	0,319	0,708
2200	1,250	0,314	0,472	150	0,010	0,924	0,924
2400	2,182	0,200	0,436	300	3,000	0,117	0,572
2600	0,375	0,567	0,716	450	0,871	0,375	0,708
2800	0,038	0,852	0,852	600	0,871	0,375	0,708
3000	0,375	0,567	0,716	750	3,000	0,117	0,572
3400	0,038	0,852	0,852	900	0,677	0,432	0,764
				1050	2,061	0,185	0,572
				1200	0,088	0,773	0,906
				1350	0,039	0,847	0,924
				1500	2,061	0,185	0,572
				1650	0,250	0,629	0,764
				1800	0,250	0,629	0,764
				1950	0,010	0,924	0,924
				2100	1,375	0,271	0,708
				2250	3,000	0,117	0,572
				2400	0,250	0,629	0,764

	Exp. I							Exp. II					
	WT			SPL+/-				WT			SPL+/-		
Distancia (μm)	\bar{x}	S.D.	n	\bar{x}	S.D.	n	Distancia (μm)	\bar{x}	S.D.	n	\bar{x}	S.D.	n
-5400	62,07	-	1	-	-	0	-4050	-	-	0	-	-	0
-5200	-	-	0	-	-	0	-3900	-	-	0	-	-	0
-5000	66,07	-	1	-	-	0	-3750	-	-	0	-	-	0
-4800	-	-	0	-	-	0	-3600	-	-	0	-	-	0
-4600	55,32	-	1	-	-	0	-3450	-	-	0	-	-	0
-4400	-	-	0	-	-	0	-3300	-	-	0	-	-	0
-4200	62,22	-	1	-	-	0	-3150	-	-	0	-	-	0
-4000	67,24	-	1	-	-	0	-3000	-	-	0	-	-	0
-3800	68,42	-	1	-	-	0	-2850	-	-	0	-	-	0
-3600	63,50	5,08	3	-	-	0	-2700	-	-	0	57,41	-	1
-3400	59,28	0,57	3	73,47	-	1	-2550	55,04	4,69	3	69,32	8,99	2
-3200	61,91	2,71	2	62,69	-	1	-2400	53,03	4,30	3	63,31	3,90	3
-3000	62,82	6,73	3	64,58	-	1	-2250	57,74	4,12	3	59,45	3,27	2
-2800	62,59	6,51	3	62,90	-	1	-2100	57,33	5,24	4	52,52	2,63	3
-2600	59,89	5,22	3	65,52	-	1	-1950	53,12	8,05	4	57,41	0,82	3
-2400	61,10	0,18	2	64,52	-	1	-1800	57,87	6,80	4	54,12	8,30	5
-2200	61,24	2,12	3	62,50	-	1	-1650	56,17	4,13	4	58,84	7,18	4
-2000	58,95	1,49	2	65,41	11,70	2	-1500	52,59	2,87	4	56,06	5,63	4
-1800	54,58	2,35	3	58,93	-	1	-1350	47,54	7,40	3	55,91	5,91	4
-1600	53,62	3,10	2	68,33	-	1	-1200	54,61	6,67	4	55,72	4,30	4
-1400	56,29	1,96	3	66,67	-	1	-1050	50,45	7,82	4	56,65	7,23	4
-1200	54,39	2,78	3	66,96	8,84	2	-900	47,58	10,89	4	55,90	7,44	5
-1000	51,02	4,71	3	61,22	3,17	2	-750	49,81	16,48	4	54,21	12,71	4
-800	52,02	11,71	3	71,27	1,80	2	-600	40,91	3,94	4	43,94	13,91	5
-600	46,88	18,98	3	57,07	3,26	2	-450	31,89	8,34	5	37,78	1,27	4
-400	27,85	15,81	2	45,69	8,71	2	-300	27,50	5,33	5	30,82	9,29	5
-200	25,86	3,76	3	31,65	1,57	3	-150	17,44	2,71	5	26,46	11,32	4
0	20,40	4,28	3	29,41	5,55	2	0	14,00	4,01	5	17,49	7,83	5
200	22,90	2,52	3	39,19	12,57	2	150	23,41	6,54	5	25,37	11,42	5
400	36,08	3,86	3	58,17	16,46	3	300	21,23	5,86	5	28,50	8,68	4
600	57,29	10,25	3	69,04	5,84	2	450	44,16	8,56	5	47,18	15,93	4
800	59,69	1,48	3	62,45	2,29	3	600	44,62	3,88	4	47,00	12,12	3
1000	61,26	2,53	3	63,46	3,13	3	750	53,34	2,25	5	59,30	5,41	5
1200	66,07	4,83	3	64,32	1,58	3	900	51,35	5,66	4	57,26	3,39	5
1400	62,17	2,32	3	65,57	6,50	3	1050	57,14	12,29	5	62,79	2,84	4
1600	63,23	1,86	3	65,98	2,62	3	1200	54,97	1,94	5	54,78	4,83	5
1800	56,50	4,64	3	62,59	0,13	2	1350	55,60	6,43	4	57,49	3,23	4
2000	59,44	4,92	3	59,41	5,53	3	1500	58,87	4,14	3	57,47	6,17	5
2200	59,29	2,74	2	58,75	1,77	3	1650	50,52	1,90	3	58,81	4,74	5
2400	58,73	1,22	3	64,96	8,14	3	1800	57,75	6,81	4	60,33	5,29	4
2600	58,03	2,79	2	60,05	1,26	2	1950	55,06	2,77	4	53,89	5,02	4
2800	56,76	1,71	2	59,13	5,34	3	2100	55,32	5,45	4	57,86	8,58	3
3000	55,91	8,36	2	62,50	2,79	2	2250	51,89	2,50	3	56,66	3,43	2
3200	57,53	-	1	60,52	0,73	2	2400	54,43	3,83	2	63,06	7,76	3
3400	58,26	3,57	2	59,51	0,70	2	2550	53,70	-	1	58,12	2,58	3
3600	-	-	0	61,43	1,48	3	2700	50,00	-	1	70,00	-	1
3800	-	-	0	62,18	-	1	2850	-	-	0	63,33	-	1
4000	-	-	0	59,46	-	1	3000	-	-	0	-	-	0
4200	-	-	0	54,67	-	1	3150	-	-	0	65,79	-	1
4400	-	-	0	-	-	0	3300	-	-	0	-	-	0
4600	-	-	0	60,61	-	1	3450	-	-	0	-	-	0
4800	-	-	0	55,29	-	1	3600	-	-	0	-	-	0
5000	-	-	0	58,90	-	1	3750	-	-	0	-	-	0
5200	-	-	0	55,29	-	1	3900	-	-	0	-	-	0
5400	-	-	0	61,80	-	1	4050	-	-	0	-	-	0
5600	-	-	0	55,79	-	1	4200	-	-	0	-	-	0
5800	-	-	0	50,53	-	1	4350	-	-	0	-	-	0
6000	-	-	0	58,42	-	1	4500	-	-	0	-	-	0
6200	-	-	0	56,60	-	1	4650	-	-	0	-	-	0

Tabla R3.13. Promedio del área de sustancia blanca preservada tras la LME en ratones silvestres y transgénicos. La tabla muestra el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (S.D.) y el número de individuos considerados para su cálculo (n) en función de la distancia (expresada en μm) al epicentro de la lesión medular (distancia "0") y de su genotipo. Las secciones con diferencias significativas, $p(\text{BH}) < 0,05$ o $p < 0,05$, están señaladas con sombreado gris y tipografía "negrita", respectivamente, para facilitar su identificación (ver Figura R3.10.B). Exp.= experimento.

Análisis de la preservación celular

A la luz de las diferencias en la preservación tisular observadas en el experimento I, decidimos complementar este estudio analizando el número de células neurales (neuronas y oligodendrocitos y astrocitos) e inmunes (microglía) presentes las distintas secciones de médula espinal para evaluar si los efectos de la deficiencia génica de *Sgpl1* observados en este experimento repercuten significativamente en la abundancia de estas poblaciones celulares tras la LME. Para unificar los criterios de identificación de los distintos tipos celulares y minimizar la subjetividad por parte del investigador, automatizamos los contajes celulares desarrollando macros¹⁶ específicas para el análisis de imagen de las secciones marcadas mediante inmunofluorescencia. En el análisis de las células astrogliales, decidimos centrarnos en las variaciones de células reactivas debido a su importancia en muchos de los procesos y eventos que se producen tras la lesión medular. Habida cuenta de la dificultad para identificar con exactitud el soma de estas células empleando las tinciones inmunofluorescentes rutinarias, decidimos estimar su abundancia en base al número de píxeles cuya intensidad, medida en una escala de 0 a 255, sea superior a 200 para el marcaje del anticuerpo contra GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) y lo relativizamos frente al número de píxeles que conforman la imagen completa de la sección medular.

Los datos obtenidos en los análisis de las distintas poblaciones celulares se muestran en el material suplementario de esta sección (Sup.Mat.19; Pág. 304) y de manera resumida en la Tabla R3.14. Nuestros resultados demuestran que, a 56dpo, los ratones con deficiencia génica en *Sgpl1* mantienen una mayor población de neuronas y de oligodendrocitos que los ratones silvestres, especialmente en la región rostral (Figura R3.11.A). De acuerdo con el test de rangos de Wilcoxon (Figura R3.11.B) ajustado para múltiples comparaciones, en ambos casos existen diferencias significativas que se localizan, principalmente, en las secciones rostrales a la lesión. En cuanto a la población de células astrogliales, se observa que los ratones *SPL*+/- tienden a presentar una menor proporción de astrocitos reactivos que los ratones WT (Figura R3.11.A) si bien, el análisis estadístico¹⁷ no reveló diferencias significativas entre ambos (Figura R3.11.B). Por último, la cuantificación de células microgliales puso de manifiesto que los ratones transgénicos presentan una mayor cantidad de estas células en las regiones más próximas al epicentro del daño medular que los ratones silvestres (Figura R3.11.A). Sorprendentemente, esta tendencia se invierte en zonas distales al epicentro, especialmente en la región caudal donde el descenso en el número de microglía en ratones transgénicos resulta claramente significativo (Figura R3.11.B).

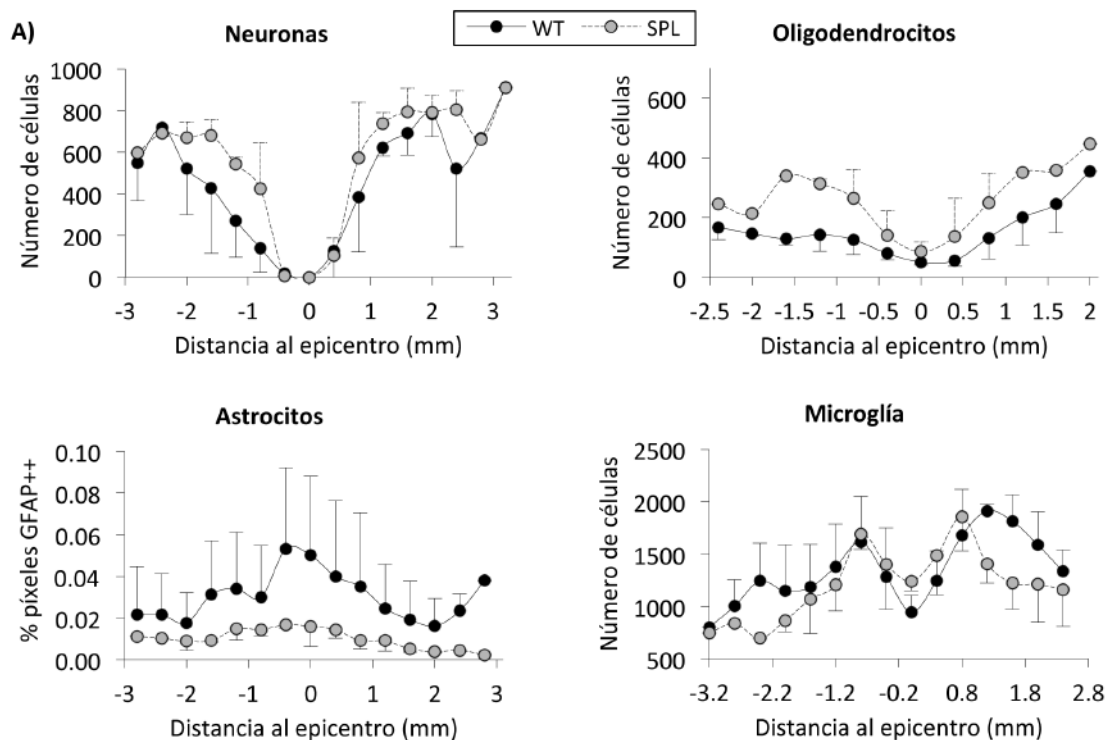
En conjunto, los estudios llevados a cabo en esta sección han permitido determinar que, la deficiencia génica de *Sgpl1* puede repercutir favorablemente sobre la recuperación funcional y la preservación tisular y celular, tras la lesión medular. No obstante, la falta de reproducibilidad de los resultados obtenidos en los dos experimentos realizados, imposibilita alcanzar una conclusión robusta.

¹⁶En este contexto, denominamos macro a un conjunto ordenado de comandos predefinidos en el software ImageJ, que permite aplicar un mismo tratamiento de imagen entre imágenes adquiridas con los mismos parámetros de captura. Toda la información relativa al diseño de las distintas macros se encuentra detallada en el apartado correspondiente de materiales y métodos.

¹⁷Para el análisis estadístico empleamos el test no paramétrico de Wilcoxon considerando como variable dependiente, el número (o porcentaje) de células y como factor, el genotipo de los animales.

Distancia (mm)	Neuronas						Oligodendrocitos					
	WT			SPL+/-			WT			SPL+/-		
	\bar{X}	S.D.	n	\bar{X}	S.D.	n	\bar{X}	S.D.	n	\bar{X}	S.D.	n
-3,2	666,5	133,6	2	-	-	0	-	-	0	-	-	0
-2,8	549,0	182,4	2	596,0	-	1	225,0	-	1	-	-	0
-2,4	719,5	46,0	2	692,0	-	1	167,0	40,6	3	245,0	-	1
-2	521,0	221,1	4	670,0	75,0	2	146,7	9,5	3	213,0	-	1
-1,6	428,0	313,4	4	680,5	77,1	2	128,7	22,0	3	339,0	-	1
-1,2	271,8	177,0	4	543,5	31,8	2	143,0	56,0	3	313,5	14,8	2
-0,8	140,3	115,9	4	425,0	220,6	2	125,7	49,6	3	265,5	95,5	2
-0,4	16,8	13,0	4	6	-	1	79,7	22,0	3	141,0	83,2	3
0	0,0	0,0	4	0	0	3	51,3	10,7	3	86,0	32,1	3
0,4	125,5	194,1	4	103,7	83,2	3	56,7	19,2	3	136,3	128,5	3
0,8	384,8	263,8	4	571,7	269,6	3	132,0	70,2	3	248,7	100,7	3
1,2	621,8	41,9	4	736,3	55,4	3	201,0	94,5	3	351,0	-	1
1,6	691,5	103,8	4	794,7	113,6	3	245,7	96,8	3	359,0	-	1
2	783,5	109,9	4	791,5	79,9	2	355,0	-	1	447,0	-	1
2,4	522,7	379,2	3	804,0	93,3	2	-	-	0	446,0	-	1
2,8	668,0	-	1	661,0	-	1	-	-	0	-	-	0
3,2	912,0	-	1	910,0	-	1	-	-	0	-	-	0
Distancia (mm)	Astrocitos						Microglía					
	WT			SPL+/-			WT			SPL+/-		
	\bar{X}	S.D.	n	\bar{X}	S.D.	n	\bar{X}	S.D.	n	\bar{X}	S.D.	n
-3,2	0,682	-	1	-	-	0	803,0	-	1	745,0	-	1
-2,8	2,178	2,314	2	1,117	-	1	1001,5	252,4	2	837,0	-	1
-2,4	2,154	1,986	3	1,034	-	1	1242,3	363,0	3	696,0	-	1
-2	1,770	1,437	3	0,894	0,452	2	1146,0	440,3	4	864,0	106,1	2
-1,6	3,141	2,576	3	0,920	0,061	2	1184,8	410,1	4	1067,5	326,0	2
-1,2	3,408	2,716	3	1,490	0,540	2	1380,0	404,6	4	1209,5	252,4	2
-0,8	2,998	2,481	3	1,453	0,318	2	1614,0	432,7	4	1686,5	143,5	2
-0,4	5,326	3,898	3	1,679	0,157	2	1284,5	465,9	4	1401,0	428,5	2
0	5,005	3,805	3	1,612	0,977	3	944,5	159,3	4	1240,3	90,1	3
0,4	4,000	3,626	3	1,435	0,398	3	1246,8	280,0	4	1486,0	375,8	3
0,8	3,510	3,551	3	0,916	0,403	3	1676,8	442,9	4	1855,3	329,3	3
1,2	2,472	2,105	3	0,918	0,506	3	1911,0	64,1	3	1403,0	179,5	3
1,6	1,924	1,860	3	0,515	0,143	3	1812,3	251,1	3	1223,7	250,0	3
2	1,627	1,329	3	0,391	0,062	2	1587,0	317,8	3	1210,0	359,7	3
2,4	2,351	0,807	2	0,452	0,009	2	1333,7	208,1	3	1159,7	350,7	3
2,8	3,799	-	1	0,241	-	1	1814,0	-	1	759,0	-	1
3,2	-	-	0	0,380	-	1	-	-	0	818,0	-	1

Tabla R3.14. Cuantificación de células neurales e inmunes tras la LME en ratones silvestres y transgénicos. La tabla muestra el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (S.D.) y el número de individuos (n) considerados para su cálculo, en función de la distancia (expresada en μm) con respecto al epicentro de la lesión medular (distancia "0") y su genotipo. Los valores corresponden al número de células por sección excepto en el caso de los astrocitos, que corresponden a la proporción de píxeles con niveles elevados (intensidad >200) del marcador GFAP expresados en "tanto por uno" del total de píxeles. Las secciones con diferencias significativas, $p(\text{BH}) < 0,05$ o $p < 0,05$, están señaladas con sombreado gris y tipografía "negrita", respectivamente, para facilitar su identificación (ver Tabla R3.11.B).



B)

Distancia (mm)	Neuronas			Oligodendrocitos		
	F(1,6)	p	p(BH)	F(1,5)	p	p(BH)
-2	2,500	0,165	0,363	N.A.	N.A.	N.A.
-1,6	5,435	0,059	0,161	N.A.	N.A.	N.A.
-1,2	15,000	0,008	0,045*	13,500	0,014	0,043*
-0,8	5,435	0,059	0,161	13,500	0,014	0,043*
-0,4	N.A.	N.A.	N.A.	1,250	0,314	0,377
0	-	-	-	6737	0,049	0,097
0,4	0,455	0,525	0,642	0,375	0,567	0,567
0,8	0,455	0,525	0,642	1,250	0,314	0,377
1,2	16,154	0,007	0,045*	N.A.	N.A.	N.A.
1,6	1154	0,324	0,509	N.A.	N.A.	N.A.
2	0,106	0,755	0,831	N.A.	N.A.	N.A.
2,4	1,154	0,324	0,509	N.A.	N.A.	N.A.

Distancia (mm)	Astrocitos			Microglía		
	F(1,5)	p	p(BH)	F(1,6)	p	p(BH)
-2	0,038	0,852	0,852	0,000	1,000	1,000
-1,6	0,038	0,852	0,852	0,455	0,525	0,630
-1,2	0,038	0,852	0,852	0,000	1,000	1,000
-0,8	0,038	0,852	0,852	1,154	0,324	0,486
-0,4	0,038	0,852	0,852	2,500	0,165	0,396
0	1,250	0,314	0,852	15,000	0,008	0,033*
0,4	0,375	0,567	0,852	1,154	0,324	0,486
0,8	1,250	0,314	0,852	0,455	0,525	0,63
1,2	1,250	0,314	0,852	15,000	0,008	0,033*
1,6	0,375	0,567	0,852	15,000	0,008	0,033*
2	0,038	0,852	0,852	2,500	0,165	0,396
2,4	0,375	0,567	0,852	1,154	0,324	0,486

Figura R3.11. Diferencias en el número de células neurales e inmunes presentes en la médula espinal de ratones transgénicos y silvestres a 56dpo (página anterior). A) Las gráficas ilustran los valores promedio y la desviación estándar del número de células neurales (neuronas y oligodendrocitos), inmunes (microglía) y la abundancia de astrocitos reactivos (tanto por uno) en las secciones medulares analizadas atendiendo a la distancia respecto al epicentro de la lesión y al genotipo de los animales. N=3 ratones SPL+/- y n=4 ratones WT. B) La tabla resume los resultados del test no paramétrico de Wilcoxon, detallando el estadístico y sus grados de libertad ($F(a,b)$), la probabilidad de que los cambios observados entre ratones transgénicos y silvestres sean significativos (p) y la probabilidad ajustada según la corrección de múltiples comparaciones de Benjamini & Hochberg ($p(BH)$). Las secciones con diferencias significativas, $p(BH)<0,05$ o $p<0,05$, están señaladas con el símbolo (*) y tipografía "negrita", respectivamente, para facilitar su identificación. La sección correspondiente al epicentro se encuentra señalada con sombreado gris. N.A.= no analizado.

LOS CAMBIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE SGPL1 TRAS LA LME SON SIMILARES ENTRE RATONES WT Y RATONES SPL+/-

Una vez completados los análisis a largo plazo de los efectos de la deficiencia parcial de Sgpl1 sobre la recuperación funcional y la preservación tisular y celular tras la lesión medular, procedimos a realizar una serie de estudios adicionales a corto plazo, destinados a evaluar los efectos a nivel molecular de la inhibición parcial de Sgpl1 en animales lesionados. Iniciamos estos estudios con un análisis de expresión génica para evaluar si, en ratones parcialmente deficientes de Sgpl1, la lesión medular induce cambios en la expresión de Sgpl1 similares a los observados en ratones silvestres (descritos en el apartado anterior de esta tesis) o si, por el contrario, los efectos de la LME difieren dependiendo del genotipo. Para facilitar la detección de posibles variaciones en el patrón de cambio, decidimos analizar la expresión de Sgpl1 antes de la lesión y a 7dpo —el tiempo post-LME analizado de mayor expresión de Sgpl1 en ratones silvestres—, comparando los cambios de expresión observados en los animales silvestres (WT) analizados en el apartado 2 con los cambios detectados en ratones deficientes de Sgpl1 (SPL+/-). Para controlar posibles variaciones de expresión génica causadas por las diferencias de progenitores y de fecha de cirugía entre los animales WT y los animales transgénicos SPL+/-, decidimos incorporar al análisis animales silvestres (SPL+/+) procedentes de la misma camada y operados en la misma fechas que los ratones SPL+/- . El cambio de expresión génica tras la lesión fue calculado como $\Delta\Delta Ct$ respecto a la expresión promedio observada en animales sin lesionar de la misma camada. Para este análisis empleamos animales hembra de 3,5 meses de edad aproximadamente, coincidiendo con las edades de los animales analizados en el apartado 2, y un diseño experimental completamente aleatorizado.

Los datos obtenidos en estos análisis se detallan en la Tabla R3.15 y se ilustran en la Figura R3.12. Sorprendentemente, los análisis estadísticos¹⁸ sugieren que el genotipo no altera de forma significativa la expresión de Sgpl1 ni antes de la lesión ($F_{(2,6)}=1,714$, $p=0,258$), ni a 7dpo ($F_{(2,8)}=3,948$, $p=0,064$), aunque en este caso las diferencias sí se acercan a la significación. Asimismo, los resultados obtenidos (Figura R3.12) muestran que la expresión de Sgpl1 experimenta una tendencia al aumento tras la lesión en ratones WT y SPL+/-, mientras que en ratones SPL+/+ esta diferencia es menos marcada. Sin embargo, el análisis estadístico de los datos de $\Delta\Delta Ct$ revela que el incremento de expresión de Sgpl1 tras la lesión no difiere significativamente entre ratones WT, SPL+/- y SPL+/+ ($F_{(2,8)}=2,186$, $p=0,175$). Por tanto, nuestros resultados sugieren que el déficit de expresión asociado a los animales mutantes SPL+/- no altera los cambios inducidos por la lesión medular en la expresión génica de Sgpl1.

¹⁸Para el análisis estadístico empleamos un test ANOVA de una vía, previa confirmación de la normalidad y homocedasticidad de los datos.

				Sgpl1		18S		\bar{x}				ΔCt	
Genotipo		Experimento		Réplica1	Réplica2	Réplica1	Réplica2	Sgpl1	18S	ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	\bar{x}	S.D.
Control	WT	Apartado 2	Exp. I	29.932	29.951	15.600	15.631	29.941	15.615	14.326	-	14.258	1.147
			Exp. II	29.532	30.591	16.857	17.108	30.061	16.983	13.079	-		
			Exp. III	33.355	32.999	17.765	17.850	33.177	17.808	15.369	-		
	SPL+/+	Exp. IV	N.D.	34.134	20.321	21.227	34.134	20.774	13.361	-	14.885	1.075	
			34.830	33.455	18.632	18.500	34.143	18.566	15.577	-			
			33.713	32.934	18.446	18.407	33.324	18.426	14.898	-			
			33.935	33.724	18.321	17.935	33.829	18.128	15.702	-			
	SPL+/-	Exp. IV	33.350	32.949	17.517	17.670	33.149	17.594	15.556	-	16.018	0.653	
			Exp. V	35.077	34.740	18.700	18.158	34.908	18.429	16.479			-

7dpo	WT	Apartado 2	Exp. I	26.891	27.253	15.273	15.392	27.072	15.333	11.739	-2.587	11.628	2.354
			Exp. II	27.635	28.029	18.820	18.404	27.832	18.612	9.220	-3.859		
			Exp. III	32.042	N.D.	17.970	18.265	32.042	18.118	13.925	-1.444		
	SPL+/+	Exp. IV	32.425	35.402	18.348	18.576	33.914	18.462	15.452	0.840	14.344	1.122	
			32.327	31.956	17.751	17.899	32.142	17.825	14.317	-0.295			
			30.258	30.800	17.674	17.757	30.529	17.715	12.813	-2.889			
			33.513	32.133	18.251	17.805	32.823	18.028	14.794	-0.908			
	SPL+/-	Exp. IV	32.411	31.554	18.253	17.556	31.982	17.905	14.078	-1.478	14.200	0.462	
			32.276	31.404	18.062	18.193	31.840	18.127	13.713	-1.843			
			33.090	33.547	19.325	18.936	33.318	19.130	14.188	-2.291			
Exp. V			33.849	33.364	18.951	18.618	33.606	18.784	14.822	-1.657			

Tabla R3.15. Expresión génica de Sgpl1 antes y después de la LME (7dpo) en ratones WT, SPL+/+ y SPL+/-. La tabla muestra la expresión de Sgpl1 y de la subunidad ribosomal 18S en muestras de médula de ratones transgénicos (SPL+/-) y silvestres (SPL+/+ y WT) en condiciones control y muestreados a 7 días post-operación (7dpo). La columna Cirugías indica la fecha de operación de los animales para la inducir el modelo de lesión medular por contusión. La información correspondiente a los animales codificados como WT está descrita en los experimentos I, II y III del apartado 2 de la presente tesis. Los animales SPL+/+ y SPL+/- operados en una misma fecha (Experimento) corresponden a animales de una misma camada. La expresión génica se expresa en valores umbral de ciclo (Ct). Las medidas 1 y 2 corresponden a las replicaciones técnicas (duplicados) de las distintas muestras. ΔCt = valores umbral de ciclo normalizados respecto a 18S. $\Delta\Delta Ct$ = valores umbral de ciclo normalizados respecto al valor promedio de los individuos sin lesionar de su misma camada y genotipo. \bar{x} = media; S.D.= desviación estándar. Exp=experimento.

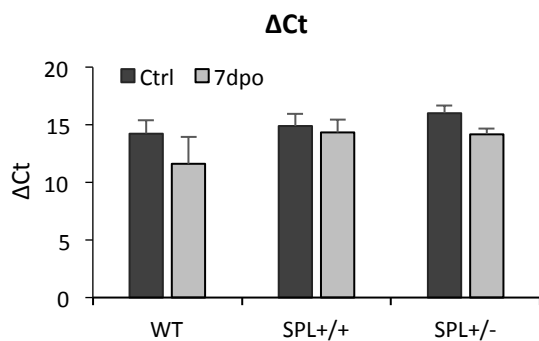


Figura R3.12. Cambios de expresión de Sgpl1 tras la lesión medular en ratones WT, SPL+/+ y SPL+/-. La grafica ilustra la expresión génica de Sgpl1 (expresada como ΔCt , normalizada frente al valor Ct del control endógeno 18S) en muestras de médula espinal de ratones WT, SPL+/+ y SPL+/- en control y muestreadas a 7 días tras la lesión medular. WT: n=3 ind/grupo, SPL+/+=4 ind/grupo; SPL+/-; n=2 ind/Ctrl y n=4/7dpo. Ctrl= control; 7dpo= 7 días post-operación.

LA DEFICIENCIA PARCIAL DE SGPL1 AUMENTA LA EXPRESIÓN PROTEICA DE SPL EN LA MÉDULA ESPINAL PERO NO ALTERA LOS CAMBIOS DE EXPRESIÓN TRAS LA LME

En el segundo estudio a corto plazo realizado para determinar los efectos a nivel molecular de la inhibición parcial de Sgpl1 tras la LME, evaluamos si el aumento de expresión génica observado en ratones SPL+/- durante la primera semana tras el trauma medular induce un aumento paralelo de la expresión proteica o si, como en el caso de los ratones silvestres, no existe una relación directa entre la expresión de Sgpl1 (gen) y de SPL (proteína).

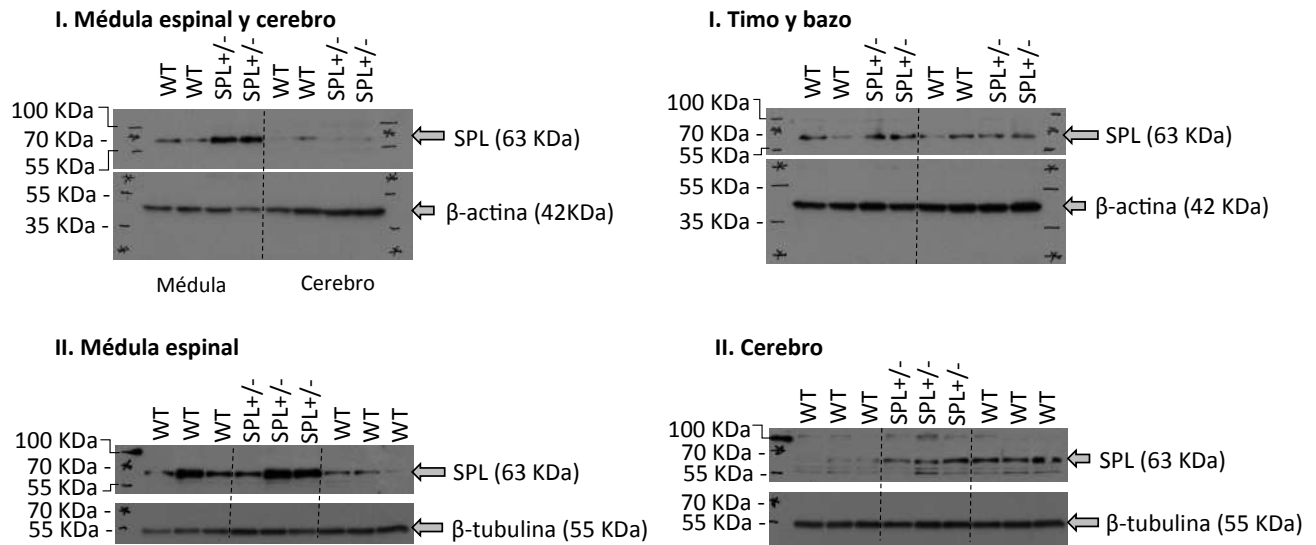
Antes de analizar los cambios en la expresión de SPL tras la lesión, evaluamos los posibles efectos de la deficiencia de Sgpl1 sobre la expresión proteica de SPL en médula espinal, cerebro, timo y bazo en condiciones basales (control), comparando la expresión en ratones WT y ratones SPL+/- . En estos análisis iniciales empleamos ratones hembra excedentes de 12 meses de acuerdo con la regla de las 3R de la experimentación animal (reemplazar, reducir y refinar). Los animales analizados procedían de dos grupos en los que extrajimos diferentes tejidos: en el primer grupo analizamos la expresión de SPL en muestras de médula espinal, cerebro, timo y bazo (n= 2ind/genotipo) mientras que en el segundo grupo restringimos el análisis a la expresión en muestras del sistema nervioso central (médula espinal y cerebro). En la Figura R3.13 se muestran los datos obtenidos mediante WB en los dos experimentos (grupos) analizados así como los resultados obtenidos tras la densitometría de las bandas correspondientes. Para el análisis estadístico de las diferencias de expresión proteica entre ratones WT y ratones SPL+/- (Figura R3.14), empleamos el test de la t de Student¹⁹. Los resultados obtenidos revelan que en médula espinal, sorprendentemente, los ratones SPL+/- presentan una expresión proteica significativamente mayor que los ratones silvestres (t=2,269, p=0,044), mientras que en cerebro, timo o bazo no se observan diferencias significativas entre los dos genotipos (t=-0,084, p=0,934; t=1,724, p=0,223; t=0,451, p=0,696, respectivamente).

Tras los ensayos en condiciones basales, evaluamos si los cambios en la expresión de SPL tras la lesión medular difieren entre ratones deficientes de Sgpl1 y ratones silvestres. Para ello, realizamos un ensayo aleatorizado analizando los cambios de expresión de SPL a 7 días post-lesión en muestras de médula espinal y de timo extraídas de ratones hembra SPL+/+ y SPL+/- de 3,5 meses de edad procedentes de la misma camada. En los análisis de la médula espinal incluimos, como grupo de referencia, los valores de ratones WT de los ensayos de WB a diferentes tiempos post-lesión realizados en el apartado 2. Los niveles de expresión estimados mediante el WB de SPL se detallan en la Figura R3.15 y se ilustran en la Figura R3.16. Como se aprecia en la gráfica correspondiente a la médula espinal, los valores de expresión de SPL a 7dpo son similares a los observados en controles

Figura R3.13. Expresión de SPL en ratones WT y SPL+/- (página opuesta). 1) Las figuras muestran las imágenes escaneadas de los WB de SPL en muestras de médula espinal, cerebro, timo y bazo de ratones silvestres y transgénicos (SPL+/-) en los dos experimentos realizados (Exp. A y Exp. B); 2) La tabla resume los datos obtenidos tras la densitometría de las bandas específicas de SPL en los WB mostrados en 1. En el caso de los datos de médula y cerebro, para hacer comparable la información de los dos experimentos realizados, los valores de densitometría fueron estandarizados antes del análisis estadístico empleando la fórmula: $SPL_{est} = (x - \bar{x})/S.D.$; dónde $x = SPL_{norm}$. SPL_{norm} =valores de SPL normalizados respecto al control interno (β -actina o β -tubulina); \bar{x} = promedio; S.D.= desviación estándar; "SPL_{est}"= valores de SPL estandarizados para cada experimento; Exp.= experimento.

¹⁹Los datos analizados cumplen los requisitos de normalidad y homocedasticidad necesarios para la aplicación de este test paramétrico.

A)



B)

		Genotipo	SPL (UU.AA)	β-actina (UU.AA)	β-tubulina (UU.AA)	SPL _{norm}	\bar{x}	S.D.	SPL _{est}
Médula espinal	Exp. A	WT	5761569	8503518	-	0,678	1,198	0,862	-0,604
			3767326	11044711	-	0,341			-0,995
		SPL +/-	15047075	9915468	-	1,518			0,371
			15360489	6808347	-	2,256			1,228
	Exp. B	WT	4265276	-	6428832	0,663	1,047	0,821	-0,467
			20411468	-	8643075	2,362			1,602
			11125690	-	10177418	1,093			0,056
			4824719	-	12646075	0,382			-0,811
			4598841	-	12953368	0,355			-0,843
		SPL +/-	589284	-	13502075	0,044			-1,223
			10408104	-	13989539	0,744			-0,369
			22574054	-	13205418	1,709			0,807
			20430418	-	9863296	2,071			1,248
	Exp. A	WT	473042	9499418	-	0,050	0,088	0,091	-0,426
			3162548	14127217	-	0,224			1,497
		SPL +/-	542406	15416338	-	0,035			-0,587
			749527	16791167	-	0,045			-0,483
		WT	331406	-	13287660	0,025	0,458	0,312	-1,388
			1210062	-	12965468	0,093			-1,169
			1786184	-	14623004	0,122			-1,076
			10916669	-	13604589	0,802			1,103
			9600790	-	15084711	0,636			0,571
		SPL +/-	11432912	-	14624368	0,782			1,036
			5691376	-	12947054	0,440			-0,060
			7460134	-	16079539	0,464			0,018
			11604205	-	15286075	0,759			0,964
Timo	Exp. A	WT	6187255	13097075	-	0,472	-	-	-
			1964355	14096196	-	0,139	-	-	-
		SPL +/-	10490418	16568024	-	0,633	-	-	-
			7936205	14052903	-	0,565	-	-	-
	Exp. B	WT	1535234	16193560	-	0,095	-	-	-
			6479083	17605731	-	0,368	-	-	-
		SPL +/-	4731012	18090388	-	0,262	-	-	-
			6667983	20312510	-	0,328	-	-	-
Bazo	Exp. A	WT	1535234	16193560	-	0,095	-	-	-
			6479083	17605731	-	0,368	-	-	-
		SPL +/-	4731012	18090388	-	0,262	-	-	-
			6667983	20312510	-	0,328	-	-	-

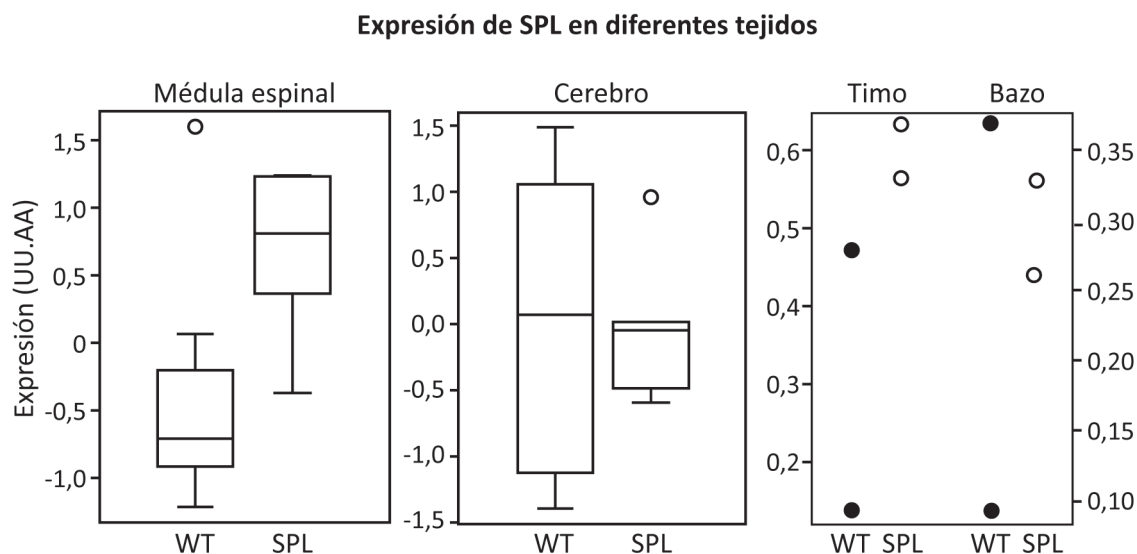


Figura R3.14. Diferencias en la expresión de la enzima SPL entre ratones WT y ratones SPL+/-. Las gráficas muestran la expresión de SPL en médula espinal, cerebro, timo y bazo de ratones silvestres y ratones con deficiencia génica en *Sgpl1*. Los gráficos de cerebro y médula muestran los valores estandarizados (SPLest) en diagramas de caja y bigotes para facilitar su visualización, mientras que los gráficos para timo y bazo (a la derecha) muestran directamente los datos normalizados (SPLnorm) de los individuos estudiados.

tanto en ratones SPL+/+ como en SPL+/- . De hecho, los análisis estadísticos realizados, empleando tests de la t de Student²⁰ confirman que, al igual que ocurre en los ratones silvestres de referencia, no existen cambios significativos tras la LME ni en ratones SPL+/+ ($t=-1,740$, $p=0,224$) ni en ratones SPL+/- ($t=0,010$, $p=0,992$).

Interesantemente, los datos obtenidos también permiten comparar la expresión de SPL en ratones transgénicos y silvestres sin lesionar. Los resultados demuestran que, de acuerdo con las observaciones descritas previamente en animales adultos (aprox. 12 meses), la expresión de SPL en la médula espinal de ratones SPL+/- jóvenes (aprox. 3,5 meses) es mayor a la observada en los ratones silvestres de su misma camada aunque, en este caso, la significación es únicamente del 90% ($t = 3,193$, $p = 0,085$), probablemente debido a limitaciones de diseño (muestras no apareadas) y de tamaño muestral.

Por su parte, los datos obtenidos mediante el WB de SPL en muestras de timo (Figura R3.15 y Figura R3.16) indican que, antes de la lesión, la expresión de SPL es similar en animales transgénicos y silvestres de la misma camada. El análisis estadístico confirma la similitud observada en la expresión de SPL de los animales SPL+/+ y SPL+/- antes de la lesión ($t= -0,280$, $p = 0,793$). A los 7 días tras la lesión, se observa una ligera tendencia al aumento de expresión de SPL en los ratones transgénicos que no se aprecia en los individuos SPL+/+ . Sin embargo, los análisis estadísticos revelan que estas diferencias no son significativas en ninguno de los casos (SPL+/-: $t=1,296$, $p=0,286$; SPL+/+: $t= -0,250$, $p = 0,815$).

²⁰En todas las comparaciones estadísticas entre los datos de control y 7dpo aplicamos el test de la t de Student, a excepción del caso de la médula espinal de ratones SPL+/+ debido a la heterocedasticidad de los datos. En esta comparación, empleamos el test de Welch, equivalente a la t de student para muestras heterocedásticas.

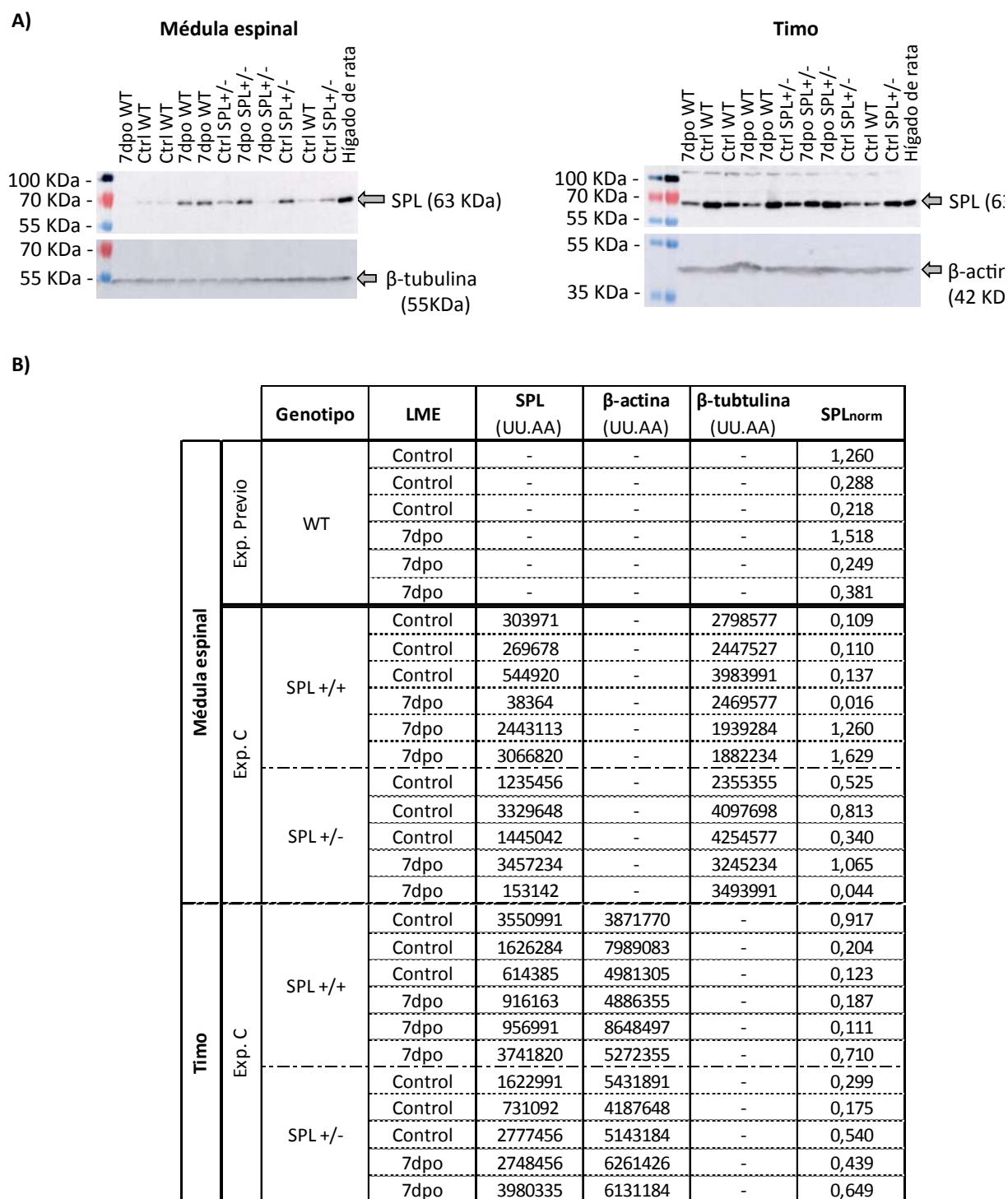


Figura R3.15. Expresión de SPL en ratones WT y SPL+/- tras la lesión medular. A) Imágenes obtenidas mediante el WB de SPL en muestras de médula espinal y tímo de ratones SPL+/+ y SPL+/- extraídas antes (Control) y a 7 días tras la lesión (7dpo). B) La tabla resume los resultados obtenidos tras la densitometría de las bandas específicas obtenidas en los ensayos ilustrados en (A) y (B). "SPLnorm"= valores de densitometría de SPL normalizados respecto al control interno (β-actina o β-tubulina). Exp.= experimento; dpo= días post-operación.

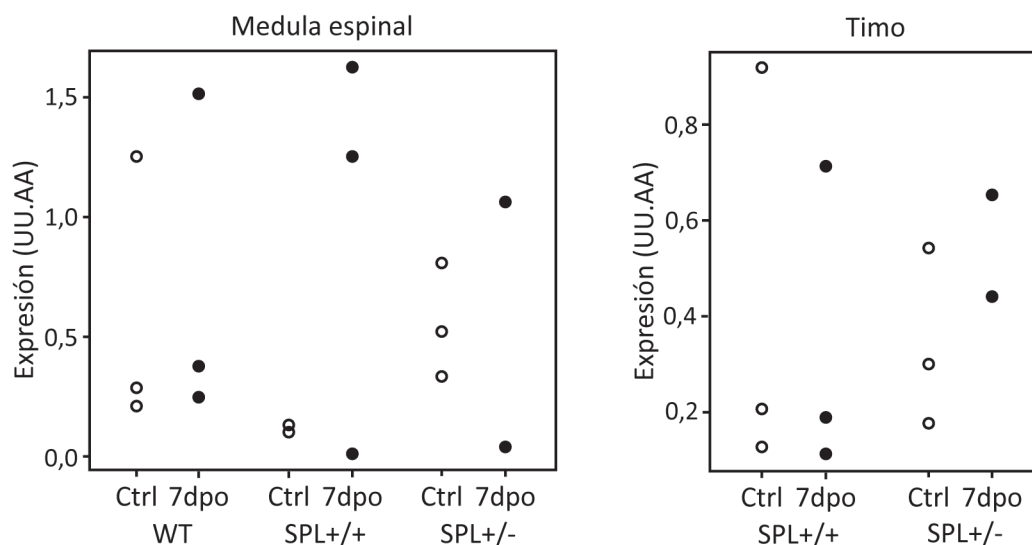


Figura R3.16. Cambios en la expresión proteica de SPL tras la lesión medular en ratones silvestres y ratones deficientes en *Sgpl1*. Las gráficas muestran los valores de expresión de SPL en médula espinal y timo de muestras control (Ctrl) y extraídas a 7 días post-operación (7dpo), procedentes de ratones silvestres (SPL+/+) y ratones transgénicos (SPL+/-) de la misma camada. Los valores corresponden a los valores SPLnorm (normalizados frente a β -tubulina) recogidos en la tabla de la Figura R3.15. Las muestras de médula espinal incluyen también la comparación con los valores para animales silvestres (WT) obtenidos en los análisis realizados previamente (apartado 2).

Así pues, en conjunto, nuestros análisis demuestran que la deficiencia génica de *Sgpl1* induce un aumento de la expresión en la médula espinal (pero no en otros órganos) antes de la lesión. Sin embargo, no causa cambios en la expresión proteica de SPL a los 7 días tras la LME ni en médula espinal, coincidiendo con lo observado en los animales silvestres analizados en el apartado 2, ni en timo.

LA DEFICIENCIA PARCIAL DE *SGPL1* NO INFLUYE EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SPL

El tercer estudio realizado a corto plazo tiene como objetivo evaluar si la inhibición parcial de *Sgpl1* tiene efectos sobre la actividad enzimática de SPL en la médula espinal, el cerebro y el timo, tanto en condiciones control como tras la LME. Debido a la ausencia de información previa sobre la aplicación del ensayo de actividad enzimática de SPL en muestras de cerebro y timo decidimos realizar, en primer lugar, la puesta a punto de la concentración óptima de proteína en estos órganos para llevar a cabo el ensayo enzimático²¹. Del mismo modo, decidimos completar ese análisis evaluando paralelamente si la adición de piridoxal-5'-fosfato (PLP; cofactor) exógeno condiciona los valores de actividad enzimática. En estos análisis empleamos ratones silvestres hembra de 12 meses (sin lesionar), excedentes de la colonia, de acuerdo con la regla de las 3R de la experimentación animal (reemplazar, reducir y refinar). Los datos obtenidos en estos análisis se muestran en el material suplementario de esta sección (Sup.Mat.20; Pág. 305) y de manera resumida en la Tabla R3.16 y la Figura R3.17. Como se aprecia en la Figura R3.17.A, la medida de la actividad de SPL depende de forma logarítmica de la concentración total de proteína en la muestra, tanto en presencia como en ausencia del cofactor PLP ($R^2=0,99$ en ambos casos). La comparación de los valores con PLP/sin PLP mediante intervalos de confianza del 95 (IC95%) demuestra que, como se aprecia en la

²¹Nótese que, en el apartado 2 de la presente tesis, se desarrolló la puesta a punto de concentración óptima de proteína en médula espinal para realizar el ensayo de actividad enzimática de la SPL.

	[mg/mL]	Con PLP		Sin PLP	
		\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.
Cerebro	10	4152,2	415,5	4164,0	625,8
	8	3713,7	549,6	3657,8	485,5
	6	3204,0	478,9	3231,5	328,7
	4	2655,0	330,4	2663,8	254,6
	2	1741,0	277,5	1811,3	277,3
	1	1071,3	127,6	1130,8	104,9
	0,5	576,3	94,0	616,5	126,5
	0,25	313,7	21,8	353,7	38,2
	0,125	153,2	26,2	177,3	25,0
Timo (12 meses)	6	1963,8	315,6	2196,7	415,4
	4	1898,2	488,9	1970,2	357,8
	2	1725,0	835,0	1668,7	694,7
	1	1737,0	826,2	1964,0	744,9
	0,5	1582,5	699,8	1737,0	810,7
	0,25	1237,2	654,0	1427,2	775,3
	0,125	877,5	594,5	952,5	771,8
Timo (3,5 meses)	6	3326,2	182,6	2816,0	187,7
	4	2332,3	197,5	2029,3	236,4
	2	1394,2	58,2	1167,0	103,5
	1	768,3	51,1	695,3	55,7
	0,5	446,5	22,1	409,0	36,3
	0,25	231,3	10,1	244,7	2,8
	0,125	140,3	23,3	181,5	10,5

Tabla R3.16. Actividad SPL a diferentes concentraciones de proteína en muestras de cerebro y timo. En la tabla se recogen los valores promedio de actividad de SPL a distintas concentraciones de extracto de cerebro y timo, en presencia y ausencia de PLP. Los valores mostrados corresponden al promedio de tres individuos con dos repeticiones técnicas, una vez eliminada la señal inespecífica correspondiente (blanco). PLP= piridoxal-5'-fosfato; \bar{X} = promedio; S.D.= desviación estándar.

Figura R3.17.B, la presencia o ausencia del cofactor PLP no altera de forma significativa las medidas de actividad. Por su parte, las medidas de la actividad de SPL en los extractos de timo de animales adultos, sorprendentemente, no muestran variaciones dependientes de la concentración de proteína (Figura R3.17.C). Teniendo en cuenta que el timo degenera con la edad, decidimos comprobar si la ausencia de relación entre la concentración proteica y la actividad de SPL es consecuencia de la edad o si, en el timo, la relación entre actividad y la concentración es distinta a la observada en órganos del sistema nervioso central. Para ello, empleamos ratones silvestre hembra de 3,5 meses de edad. Los datos obtenidos en este análisis se detallan en el material suplementario correspondiente (Sup.Mat.20; Pág. 305) y se muestran resumidamente en la Tabla R3.16. Como se aprecia en la Figura R3.17.D, los resultados obtenidos demuestran que, en individuos jóvenes, la actividad de SPL en timo depende de forma lineal (en el rango analizado) de la concentración de proteína, tanto en presencia como en ausencia de PLP ($R^2 > 0,99$ en ambos casos). Adicionalmente, los intervalos de confianza del 95% a las diferentes concentraciones aparecen prácticamente centrados en 1 (valores iguales con y sin PLP), indicativo de que la adición de PLP exógeno no causa cambios significativos en las medidas de la actividad de SPL respecto a las medidas realizadas en ausencia del cofactor (Figura R3.17.E).

Al igual que en la determinación de la concentración óptima de proteína para el ensayo de actividad enzimática de SPL en muestras de médula espinal (ver Figura R2.6), los resultados obtenidos en estos ensayos muestran un perfil similar, donde la actividad de SPL depende de la concentración de

proteína analizada en la muestra pero no de la adición o no del cofactor PLP. Considerando los resultados obtenidos, particularmente el rango donde se mantiene una relación lineal entre concentración y actividad, decidimos establecer la concentración de 2,5mg/mL de proteína total como la concentración óptima para este ensayo tanto en cerebro como en tino coincidiendo,

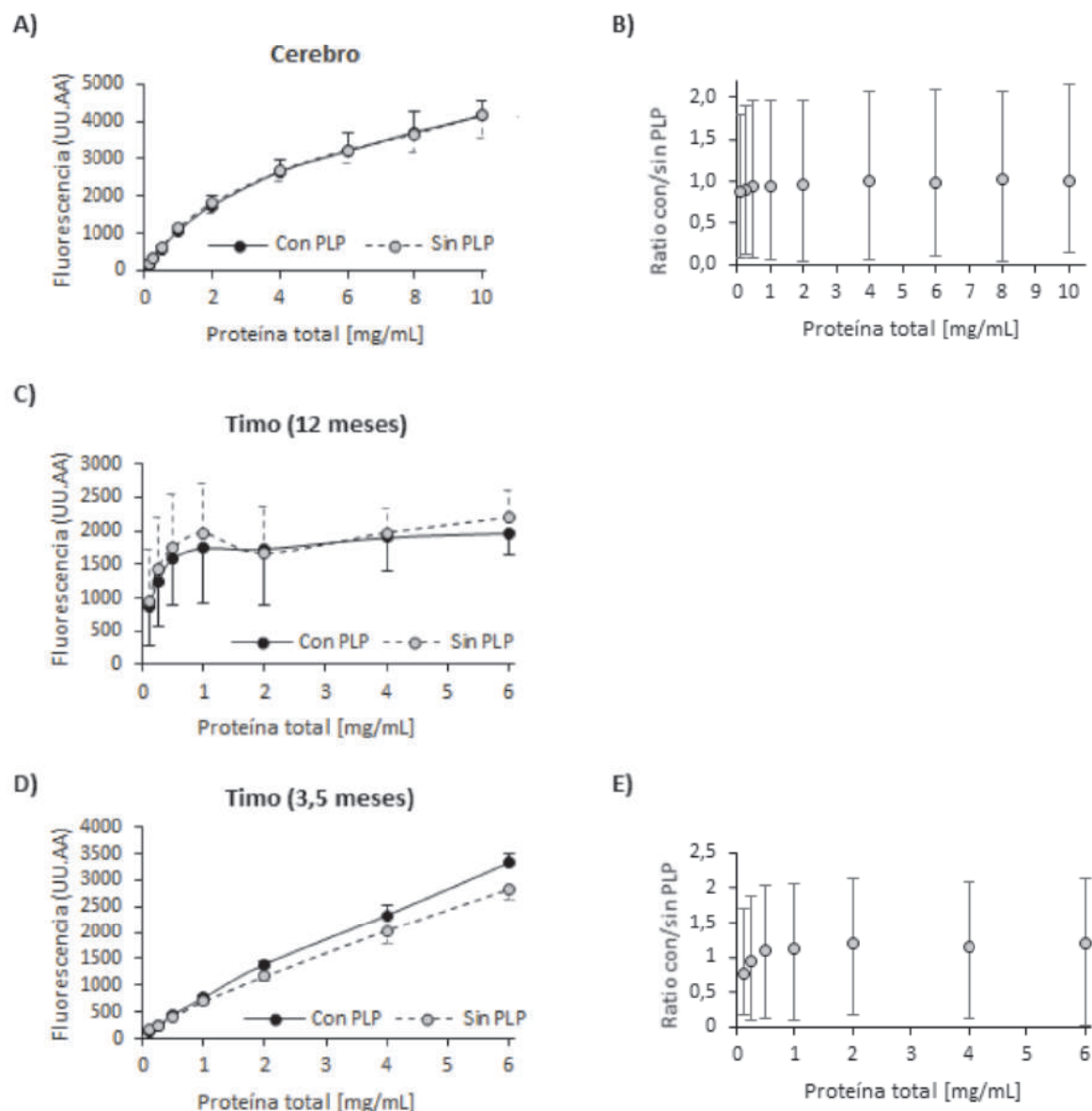


Figura R3.17. Relación entre la actividad SPL y la concentración de proteína en muestras de cerebro. Las gráficas A, C y D muestran el valor promedio de la actividad de SPL (medida como fluorescencia; UU.AA en muestras de extracto de cerebro, tino extraído de ratones adultos (12 meses) y tino de ratones jóvenes (3,5 meses), así como su desviación estándar ($n=3$ individuos en todos los casos). Como se puede apreciar la relación entre la concentración y la actividad medida en cerebro sigue una curva logarítmica en el intervalo medido pero aproximadamente lineal en el intervalo entre 0,125-4 mg/mL. En el caso de tino (3,5 meses) la relación entre la concentración y la actividad medida es aproximadamente lineal en el intervalo analizado. B y E) Intervalos de confianza al 95% de la tasa entre muestras con y sin PLP a diferentes concentraciones. La tasa está calculada como la medida de fluorescencia en presencia de PLP dividida por la medida de fluorescencia en ausencia de PLP para cada concentración analizada. PLP=piridoxal-5'-fosfato.

además, con la establecida en el apartado anterior para muestras de médula espinal. Además, decidimos llevar a cabo los análisis con el suplemento de cofactor PLP, de acuerdo con el protocolo aconsejado por el grupo que desarrollo el ensayo (Bedia *et al.*, 2009).

Definidos los parámetros óptimos para llevar a cabo el ensayo de actividad de SPL tanto con muestras médula espinal como con muestras de cerebro y de timo, evaluamos si la deficiencia de expresión génica de *Sgpl1* afecta a la actividad enzimática de SPL en estos órganos. Para estos análisis, extrajimos muestras de ratones hembra SPL+/+ y SPL+/- de 12 meses de edad, empleando un diseño experimental de bloques aleatorizados en el que cada uno de los dos experimentos realizados (cada uno con dos replicaciones) actúa como factor bloque. Debido a que las medidas de actividad de SPL en muestras de timo de animales adultos podría no resultar fiable, decidimos incluir un análisis adicional empleando muestras de timo de ratones hembra de 3,5 meses de edad (n=1 ratones SPL+/+; n=3 ratones SPL+/-). Los datos obtenidos en estos ensayos se muestran en la Tabla R3.17 y

			Réplica1	Réplica2	Réplica3	Mediana	Med ₀	\bar{X}	S.D.
Médula espinal	Exp. I	SPL+/+	1611	1550	1568	1568	-	1612,00	62,23
			1656	1623	1667	1656	-		
		SPL+/-	1587	1560	1625	1587	-	1437,00	212,13
	Exp. II	SPL+/+	1287	1299	1200	1287	-		
			1266	1265	1266	1266	494	428,50	92,63
		SPL+/-	1135	1144	1128	1135	363		
Cerebro	Exp. I	SPL+/+	954	985	1003	985	213	338,50	177,48
			1241	1236	1201	1236	464		
		SPL+/-	2030	2014	2013	2014	-	2272,50	365,57
	Exp. II	SPL+/+	2532	2509	2531	2531	-		
			2443	2266	2523	2443	-	2535,00	130,11
		SPL+/-	2964	2371	2627	2627	-		
Timo	12 meses	Exp. I	1813	1826	1818	1818	1046	1136,50	127,99
			2015	1988	1999	1999	1227		
			1889	1870	1906	1889	1117		
		Exp. II	1900	1961	1932	1932	1160	1138,50	30,41
			1700	1693	1744	1700	-		
			1586	1812	1497	1586	-		
	3,5 meses	Exp. I	1901	1869	1914	1901	-	1643,00	80,61
			1868	1934	1919	1919	-		
			2331	2250	2368	2331	1559	1619,00	84,85
		Exp. II	2451	2394	2635	2451	1679		
			1838	1929	1909	1909	1137		
			1599	1665	1705	1665	893	1015,00	172,53
Blanco	Exp. II	SPL+/-	2745	2687	-	2716	1932	1932,00	-
			2645	2739	-	2692	1908		
			2658	2575	-	2616,5	1832,5		
	Exp. III	SPL+/-	2887	2738	-	2812,5	2028,5	1923,00	98,86
			788	772	752	772	-		
			769	799	-	784	-		

Tabla R3.17. Actividad de SPL en ratones SPL+/- y ratones SPL+/+. La tabla recoge los valores de actividad de SPL (medida como fluorescencia; UU.AA) tras el análisis mediante el ensayo de actividad de muestras de proteína (2,5mg/mL) de médula espinal, cerebro y timo. Las muestras fueron extraídas de animales de 12 meses de edad. Además, en los análisis del timo también se extrajeron muestras de individuos de 3,5 meses. Se detallan los valores de la muestra sin extracto proteico (blanco) para el Exp. II y el Exp. III. Med₀=mediana_{valor} - mediana_{blanco}; \bar{X} = promedio; S.D.= desviación estándar; Exp.= experimento.

se ilustran en la Figura R3.18. Los análisis estadísticos de estos datos²² revelan que no existen diferencias significativas en la actividad de SPL entre ratones SPL+/- y ratones SPL+/+ en ninguno de los órganos analizados (médula espinal: $F_{(1,1)}=1,897$, $p=0,227$; cerebro: $F_{(1,1)}=0,867$, $p=0,395$; timo (12 meses): $F_{(1,1)}=0,671$, $p=0,450$). En el análisis del efecto del genotipo sobre la actividad SPL en timo de individuos juveniles (3,5 meses de edad), la falta de individuos SPL+/+ no permitió realizar el análisis estadístico de los datos, si bien la actividad observada en el individuo silvestre corresponde, prácticamente, a la mediana de la actividad en ratones SPL+/- (Tabla R3.17), por lo que podemos asumir que, al igual que en el resto de tejidos, la deficiencia génica de *Sgpl1* no afecta a la actividad enzimática de SPL en individuos sin lesionar (control).

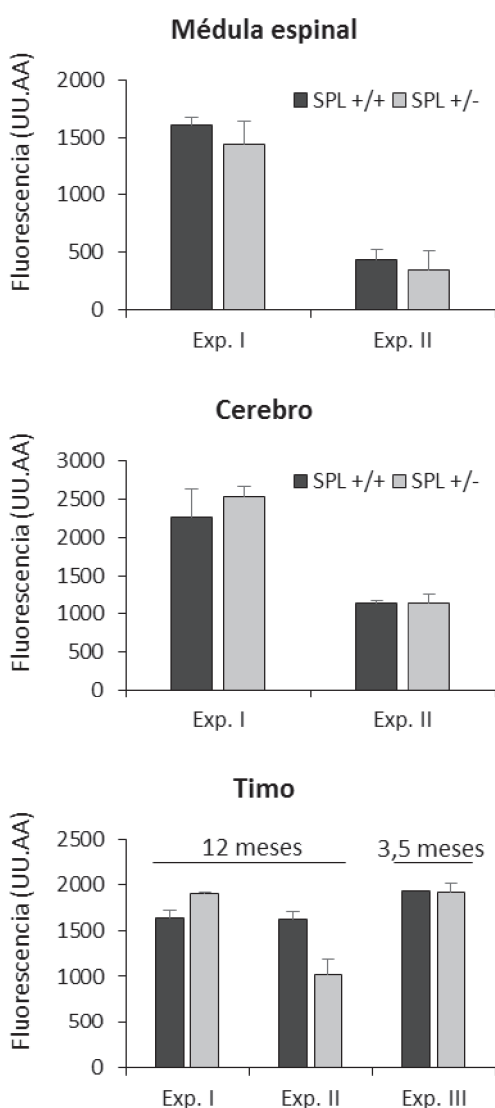


Figura R3.18. Diferencias de actividad de SPL entre ratones transgénicos y ratones silvestres. La figura muestra el promedio de la actividad de SPL (medida como fluorescencia; UU.AA) en muestras de médula espinal, de cerebro y de timo procedentes de ratones adultos (12 meses) silvestres (SPL+/+) y transgénicos (SPL+/-) sin lesionar. $n=2$ ind/genotipo. El Exp. III corresponde a un análisis incorporado para evaluar la actividad de SPL en muestras de timo de ratones jóvenes (3,5 meses) SPL+/+ ($n=1$) y SPL+/- ($n=3$).

Para completar los análisis y evaluar si la deficiencia génica de *Sgpl1* altera los efectos de la lesión medular sobre la actividad enzimática de SPL, comparamos las medidas de actividad en muestras de médula espinal y de timo extraídas de ratones hembra SPL+/+ y SPL+/- de 3,5 meses de edad (procedentes de la misma camada) en condiciones control y a 7 días post-operación, de acuerdo con un diseño experimental completamente aleatorizado. En estos ensayos, decidimos medir la actividad enzimática tanto en presencia como en ausencia de PLP exógeno para evaluar si, a consecuencia de la lesión medular, se producen cambios en los requerimientos de PLP que pudiesen redundar en variaciones en las medidas de actividad. Los datos de actividad obtenidos se encuentran detallados en el apartado de material suplementario (Sup. Mat. 21; Pág. 306)

y se resumen en la Tabla R3.18. En el análisis de esta información, evaluamos, en primer lugar, si la presencia o ausencia de PLP exógeno altera las medidas de actividad de SPL en las muestras tomadas

²²Empleamos el test ANOVA de una vía, previa confirmación de la normalidad y homocedasticidad de los datos. En este análisis, además, consideramos los experimentos como un factor bloque para eliminar los efectos de las diferencias entre experimentos.

a 7dpo. Los resultados obtenidos²³ confirman que el suplemento del cofactor no redundaba en diferencias significativas en la actividad de SPL en los dos tejidos analizados, tanto en ratones silvestres como transgénicos (Figura R3.19). Estos análisis también demuestran que, al igual que en los animales silvestres, el suplemento de PLP no afecta a las medidas de actividad de SPL en ratones SPL+/- sin lesionar.

			Con PLP		Sin PLP	
			\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.
Médula espinal	SPL+/+	Control	875,8	24,4	924,3	39,2
		7dpo	1133,8	230,2	1124,0	224,7
	SPL+/-	Control	970,0	288,3	1111,3	246,8
		7dpo	1373,8	151,7	1483,3	158,0
Timo	SPL+/+	Control	1133,5	109,6	1220,0	78,5
		7dpo	1057,8	207,2	1140,8	200,6
	SPL+/-	Control	1923,0	98,9	1909,8	80,1
		7dpo	1873,0	11,3	1883,8	80,3

Tabla R3.18. Comparación de la actividad de SPL tras la LME en ratones transgénicos y ratones silvestres. La figura muestra los promedios (\bar{X}) y la variabilidad (desviación estándar, S.D.) de las medidas de actividad de SPL (medida como fluorescencia; UU.AA) en médula espinal y timo procedentes de ratones juveniles (3,5 meses) silvestres (SPL+/+) y transgénicos (SPL+/-) antes (control) y 7 días tras la lesión medular (7dpo). En la tabla se distinguen los valores de actividad SPL en presencia y ausencia de PLP exógeno. SPL+/+ (control): n=2; SPL+/+ (7dpo): n=3; SPL+/- (control): n=3; SPL+/- (7dpo): n=2. PLP= piridoxal-5'-fosfato.

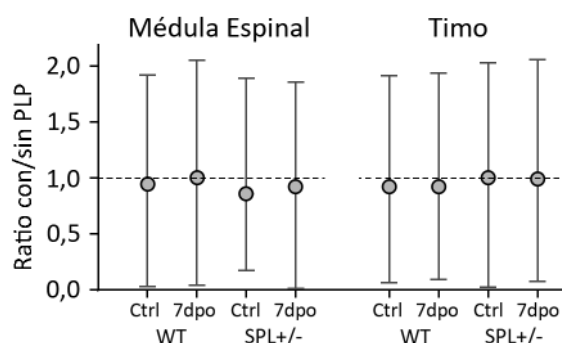


Figura R3.19. Efecto del PLP sobre la actividad de SPL tras la LME en ratones SPL+/+ y ratones SPL+/-. La gráfica muestra los intervalos de confianza (al 95%) de la tasa entre muestras control y extraídas a 7 días post-operación, medidas en presencia y ausencia de PLP.

Una vez confirmada la falta de efecto del PLP exógeno, procedimos a comparar los cambios de actividad tras la lesión. Como se puede observar en la Figura R3.20, independientemente del órgano y del genotipo estudiado, apenas se producen cambios de actividad de SPL a 7dpo respecto a la registrada en condiciones control. Aunque en la médula espinal se aprecia un ligero aumento a los 7 dpo tanto en ratones transgénicos como silvestres, los análisis estadísticos realizados²⁴ demuestran que estos cambios de actividad de SPL no pueden considerarse significativos ni en los ratones SPL+/- ($t=2,039$, $p=0,135$) ni en los animales silvestres ($t=1,926$, $p=0,190$). Estos resultados coinciden con la ausencia de diferencias significativas en la actividad de SPL en médula espinal de ratones silvestres a 7 días tras el trauma descrita previamente en el apartado 2 de esta tesis (Figura R2.8). En relación a la actividad de SPL en timo, nuestros resultados demuestran que

²³Para este análisis empleamos intervalos de confianza al 95%.

²⁴En estos casos, empleamos el test de Welch, equivalente a la t de student para muestras heterocedásticas.

tampoco se producen cambios significativos a 7dpo respecto a control, ni en ratones SPL+/+ ($t=-0,531$, $p=0,632$) ni en ratones SPL+/- ($t=-0,868$, $p=0,474$).

En conjunto, los resultados de esta sección demuestran que la inhibición parcial de Sgpl1 no modifica la actividad enzimática de SPL en ninguno de los órganos analizados ni en condiciones control ni a los 7 días tras la lesión medular.

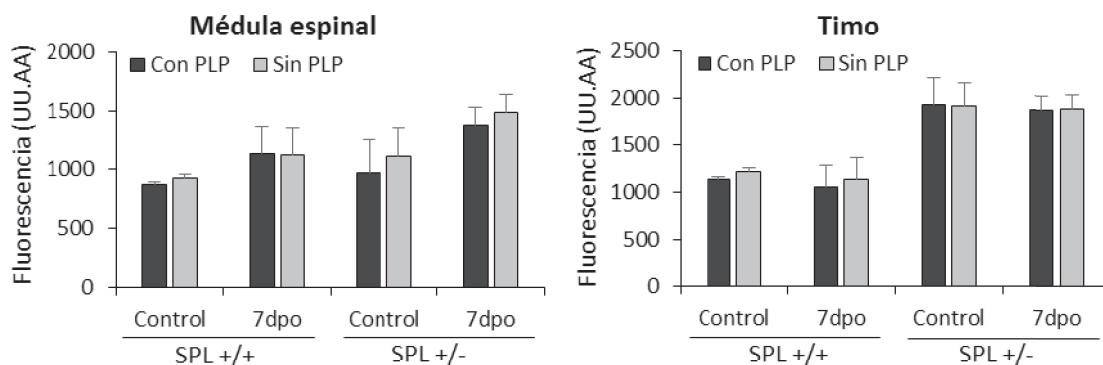


Figura R3.20. Cambios de la actividad de SPL tras la LME en ratones SPL+/+ y ratones SPL+/-. La figura muestra la actividad de SPL (expresada como fluorescencia; UU.AA) en condiciones control (Control) y a 7 días post-operación (7dpo) en muestras de médula espinal y de timo procedentes de ratones silvestres (SPL+/+) y ratones transgénicos (SPL+/-). En la gráfica se muestran, a modo ilustrativo, las diferencias al realizar el ensayo de actividad enzimática en presencia y ausencia de PLP exógeno. Nótese que las medidas de la actividad de SPL para ratones SPL+/+ y SPL+/- se realizaron en ensayos independientes, por lo que las diferencias de actividad observadas entre genotipos para una misma condición (v.g.: controles) pueden ser consecuencia de diferencias entre ensayos y no necesariamente de la deficiencia génica de Sgpl1. Por tanto, la comparación entre genotipos se realiza únicamente a nivel de los cambios (incrementos) tras la lesión y no de los valores de cada condición (controles y 7 dpo). PLP=piridoxal-5'-fosfato.

LA DEFICIENCIA GÉNICA DE SGPL1 ALTERA LA CONCENTRACIÓN DE ALGUNOS ESFINGOLÍPIDOS SIN AFECTAR A LA DE S1P

En el último estudio a corto plazo evaluamos si la inhibición parcial de Sgpl1 induce cambios, antes o después de la lesión medular, en los niveles de esfingolípidos, con especial atención a los niveles de S1P y Sph. Para ello, analizamos muestras de médula espinal, sangre y suero procedentes de individuos hembra (SPL+/-) de 3,5 meses sin lesionar y lesionados (7dpo) mediante espectrometría de masas (*Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*; UPLC-MS). Estos análisis, incluyendo la metodología, las especies analizadas y el tratamiento de datos, fueron realizados siguiendo los procedimientos descritos en el primer apartado de la presente tesis para el análisis de esfingolípidos en ratones silvestres. Para identificar los efectos de la inhibición parcial de Sgpl1 sobre los niveles de esfingolípidos, los resultados obtenidos en estos análisis se compararán con los resultados previos de animales silvestres descritos en el primer apartado de la tesis.

Los valores de las áreas cromatográficas de cada especie de esfingolípido obtenidos tras el análisis de las muestras mediante UPLC-MS se recogen en las tablas correspondientes del material suplementario (Sup.Mat.22.A-C; Pág. 307). Antes de proceder al procesado y análisis de estos datos,

realizamos un control de calidad mediante el análisis de las áreas cromatográficas de los estándares internos (“spikes”)²⁵ incorporados a las muestras (Tabla R3.19) destinado a evaluar la homogeneidad en la extracción y la espectrometría de masas de todas las muestras.

Tejido	Individuo	SM12:0	dhSM	Cer12:0	GluCer12:0	Sph C17	S1P C17-P
Médula espinal	LY202	480	7381	6039	4536	303	223
	LY203	1018	7161	7486	2262	298	198
	LY204	1241	7397	8353	1915	281	180
	LY213	1177	7096	8229	1894	293	173
	LY214	1313	6211	7584	1336	231	125
	LY215	1310	6902	8194	1486	266	139
Sangre	LY202	401	3693	3485	1778	111	F.S.
	LY203	435	3797	3370	1824	97	F.S.
	LY204	416	3587	3451	1812	149	F.S.
	LY213	352	3225	3003	1885	122	F.S.
	LY214	303	3131	2891	1668	85	F.S.
	LY215	430	4061	3726	2359	168	F.S.
Suero	LY202	216	3164	2969	2321	215	99
	LY203	220	3641	3460	2442	239	115
	LY204	283	4080	3653	2391	250	65
	LY213	282	4286	4054	2662	228	65
	LY214	170	2899	2751	2007	162	72
	LY215	270	3622	3476	2228	206	98

Tabla R3.19. Valores de los “spikes” analizados en cada muestra. En general, se emplea el mismo “spike” para la normalización de las familias insaturadas (v.g.: dihidroceramidas) que para sus equivalentes saturadas (i.e.: la familia dhCer será normalizada con el “spike” de la familia Cer, es decir, Cer12:0), por lo que las familias insaturadas no presentan “spike” propio. Las familias SM y dhSM están normalizadas con respecto al “spike” SM12:0, sin embargo, para el análisis de SM fue necesario diluir la muestra motivo por el que, pese a ser el mismo “spike” sus valores difieren.

Los análisis de los valores de los “spikes” mediante boxplot (Sup.Mat.23; Pág. 310) y el test de Dixon (Sup.Mat.24; Pág. 312) dieron lugar a resultados análogos, identificando como potencialmente anómalos, los valores 480 (SM12:0), 6039 (Cer12:0) y 4536 (GluCer12:0) de la muestra de médula espinal del individuo LY202 y el valor 2359 (GluCer12:0) de la muestra de sangre del individuo LY215. En vista de estos resultados, decidimos excluir la muestra LY202 de médula espinal de cualquier análisis posterior. Por el contrario, consideramos como válidos los valores de la muestra de sangre del individuo LY215 debido a que los datos, una vez normalizados, presentan unos niveles coherentes con los observados en otros individuos del mismo grupo (7dpo).

Los valores de concentración obtenidos tras el procesamiento de los datos del UPLC-MS se recogen en el apartado correspondiente del material suplementario (Sup.Mat.25.A-C; Pág. 313). En la Tabla R3.20 se resumen los porcentajes de las distintas familias de esfingolípidos, así como el total de esfingolípidos, en las muestras de médula espinal, sangre y suero ilustrados en la Figura R3.21.

Como se aprecia en la Figura R3.21.A, los ratones silvestres y los ratones transgénicos parcialmente deficientes en Sgpl1 presentan, antes y después de la lesión, un perfil de esfingolípidos similar, tanto

²⁵Los estándares internos corresponden a las especies C12:0 y C17 de las muestras analizadas.

en médula espinal como en sangre y suero. Por el contrario, la concentración total de esfingolípidos en médula espinal y sangre (Figura R3.21.B) sí difiere entre genotipos, siendo significativamente mayor en ratones transgénicos SPL+/- que en ratones WT (médula espinal: $F_{(1,1)}=24,636$, $p=0,002$; sangre: $F_{(1,1)}=9,723$, $p=0,014$)²⁶. Estos análisis estadísticos revelan además que, según el genotipo

		% SM	% dhSM	% Cer	% dhCer	% GluCer	% LacCer	% Sph	% dhSph	% S1P	Conc. Total (pmol/mg)
Médula espinal	Control	55,53	2,36	1,69	0,11	39,77	0,04	0,23	0,08	0,18	4620,96
	7dpo	48,21	2,22	1,40	0,07	46,30	0,07	0,91	0,21	0,76	3145,64
Sangre	Control	94,26	2,55	1,72	0,31	1,08	0,04	0,06	0,17	-	356831,12
	7dpo	94,04	2,68	1,96	0,36	0,86	0,04	0,12	0,21	-	264088,09
Suero	Control	90,42	1,27	2,61	0,15	3,52	0,03	0,11	-	2,12	76334,82
	7dpo	87,71	1,59	2,80	0,12	4,85	0,03	0,12	0,03	2,58	71889,89

Tabla R3.20. Abundancia total de esfingolípidos y porcentaje por familias en médula espinal, sangre y suero de ratones SPL+/-. Los datos están expresados como la mediana de los valores de los 3 individuos analizados para los grupos control y 7dpo (a excepción de las muestras de médula espinal de animales control donde n=2). Conc.= concentración; dpo= días post-operación.

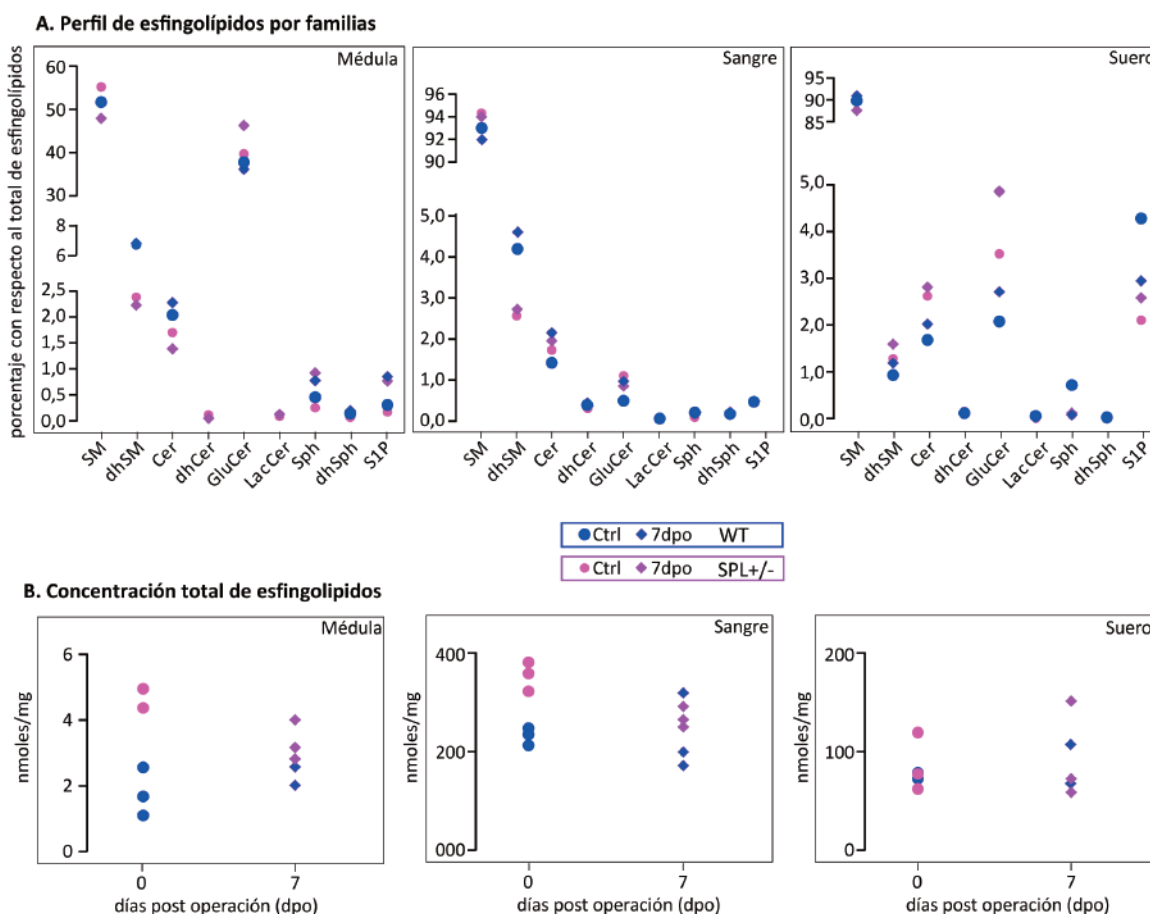


Figura R3.21. Perfil y concentración total de esfingolípidos en médula espinal, sangre y suero de ratones SPL+/- tras la LME. Las gráficas muestran los porcentajes de las distintas familias con respecto al total de esfingolípidos (A) así como la concentración total de esfingolípidos (B), antes de la lesión y a los 7 días post-operación (7dpo) en ratones SPL+/- (marcador relleno) y en ratones WT (marcador vacío; datos procedentes del apartado 1) en médula espinal, sangre y suero.

²⁶Para estos análisis empleamos test ANOVA de dos vías tras la comprobación de la normalidad y homocedasticidad de los datos.

analizado, la concentración total de esfingolípidos en la médula espinal varía significativamente tras la LME (interacción: $F_{(1,1)}=8,267$, $p=0,024$), lo cual no ocurre ni en sangre ($F_{(1,1)}=2,604$, $p=0,145$) ni en suero ($F_{(1,1)}=0,038$, $p=0,851$). Cabe destacar que, coherentemente con las diferencias en la concentración total de esfingolípidos entre SPL+/- y WT, las concentraciones de algunas familias difieren significativamente entre ambos genotipos (datos no mostrados).

El estudio en detalle²⁷ de los niveles de S1P en médula espinal de ratones WT y SPL+/- revela que la concentración de este metabolito cambia significativamente tras la lesión medular ($F_{(1,1)}=36,471$, $p=0,0005$), pero no difiere entre genotipos ($F_{(1,1)}=2,986$, $p=0,128$). Además, estos análisis demuestran que la deficiencia génica de Sgpl1 no altera el efecto de la lesión medular sobre los niveles de S1P (interacción: $F_{(1,1)}=0,895$, $p=0,376$). Por el contrario, en el caso de su precursor, la Sph, los análisis ponen de manifiesto que su concentración varía de forma significativa dependiendo tanto del genotipo como del tiempo tras la lesión medular ($F_{(1,1)}=9,889$, $p=0,016$ y $F_{(1,1)}=37,171$, $p=0,0005$, respectivamente), aunque los efectos de ambos factores son independientes entre sí (interacción: $F_{(1,1)}=0,046$, $p=0,836$).

Al evaluar la relación entre las concentraciones de S1P y Sph en las muestras de médula espinal de ratones SPL+/-, los resultados revelan un ajuste lineal casi perfecto ($R^2=0,993$), al igual que se observó en el apartado 1 para los ratones silvestres (WT). Para determinar si la relación entre las concentraciones de ambos metabolitos es similar en ratones WT y ratones SPL+/-, comparamos los datos de ambos genotipos (Figura R3.22) comprobando que el ajuste de las rectas difiere dependiendo del genotipo ($F_{(1,8)}=13,973$, $p=0,007$). De hecho, nuestros resultados demuestran un mejor ajuste de los datos al emplear rectas independientes para cada genotipo ($F_{(1,7)}=11,214$,

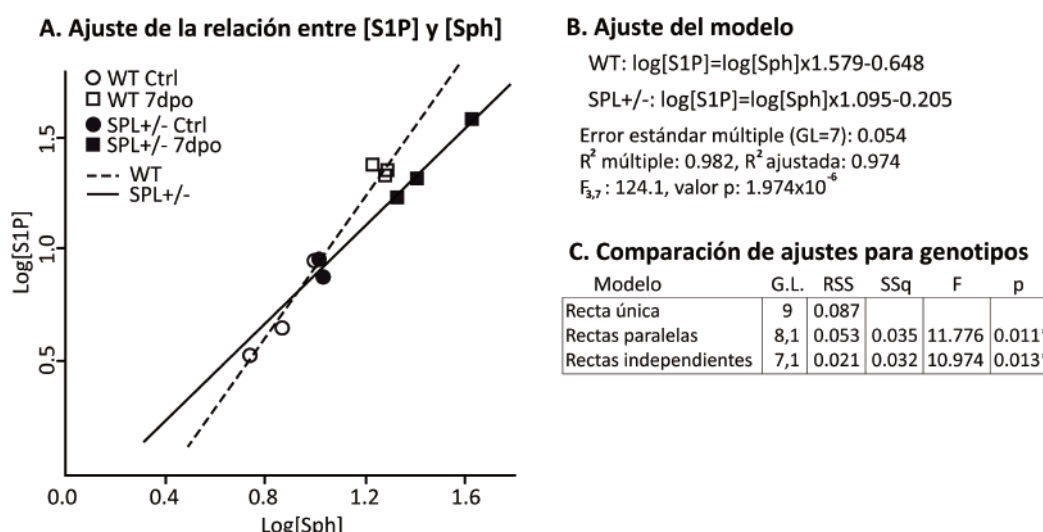


Figura. R3.22. Relación entre Sph y S1P (ratones SPL+/-). A) Gráfico bivariante comparando los logaritmos de las concentraciones de Sph y de S1P. La gráfica muestra la estrecha relación ($R^2_{adj}=0,974$; B) entre ambas especies en individuos control (ausencia de lesión) y 7dpo. C) La tabla muestra la comparación del ajuste de diferentes modelos relacionando la concentración de S1P y Sph en individuos SPL+/- y WT. G.L=grados de libertad; RSS=suma de los residuos al cuadrado; SSq=suma de cuadrados; F=estadístico F de Snedecor; p=probabilidad.

²⁷Para eliminar problemas de heterocedasticidad, transformamos los valores de S1P y Sph en sus valores logarítmicos antes de analizarlos mediante ANOVA de dos vías.

$p=0,012$), lo cual pone de manifiesto que, a pesar de la estrecha relación entre S1P y Sph observada tanto en ratones WT como en ratones SPL+/-, esta relación no es idéntica en ambos genotipos. Como se aprecia en la figura (Figura R3.22), los individuos con deficiencia de Sgpl1 (animales SPL+/-) muestran un menor aumento de la concentración de S1P que los animales silvestres (WT) a concentraciones crecientes de Sph. Interesantemente, en suero, no se observa esta clara dependencia entre las concentraciones de S1P y de Sph ($R^2=0,027$).

En conjunto, los resultados de estos análisis demuestran que la inhibición parcial de Sgpl1 no induce cambios en la concentración de S1P en médula espinal ni antes ni después de la LME. Asimismo, nuestros resultados demuestran que, tanto en animales WT como en SPL+/-, la concentración de S1P depende casi estrictamente de los niveles de Sph a 0 y 7dpo, aunque esta relación varía con la inhibición parcial de la Sgpl1. Adicionalmente, esta sección también ha puesto de manifiesto que existen diferencias en la concentración total de esfingolípidos (tanto en médula como en sangre) entre ratones SPL+/- y ratones WT.

DISCUSIÓN

La participación de S1P en numerosos procesos biológicos ha puesto de manifiesto su potencial como diana para el tratamiento de múltiples patologías (ver, por ejemplo: Spiegel & Kolesnick, 2002). Un claro ejemplo es la aprobación, por parte de la *Food and Drugs Administration* (FDA) de Estados Unidos, del Fingolimod (FTY720)²⁸ para el tratamiento de la esclerosis múltiple debido a los efectos inmunomoduladores de este mimético sintético de S1P (Strader *et al.*, 2011). El potencial terapéutico de S1P en el tratamiento de la lesión medular no solo se limita a sus efectos sobre el sistema inmune, sino también a su capacidad quimioatrayente de células madre neurales hacia el epicentro de la lesión (Kimura *et al.*, 2007) y a su capacidad para regular la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la astrogliosis (Norimatsu *et al.*, 2012).

Además de mediante análogos sintéticos, la modulación terapéutica de S1P también puede acometerse a través de la inhibición de la SPL (Bandhuvula *et al.*, 2011; Schwab *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en el apartado 2 de la presente tesis han permitido demostrar que tanto la expresión génica y proteica como la actividad enzimática de SPL aumentan tras la lesión medular, sugiriendo que la inhibición de esta enzima es potencialmente interesante para el tratamiento de la lesión medular. Para evaluar el efecto de la modulación de la SPL como estrategia terapéutica en el tratamiento de la lesión medular, en el presente apartado decidimos emplear ratones transgénicos (constitutivos) con deficiencia parcial de Sgpl1 (SPL+/-).

En primer lugar, evaluamos el efecto de la inhibición parcial de Sgpl1 sobre la recuperación funcional, la preservación tisular y la supervivencia celular en el modelo murino de lesión medular por contusión empleado en los distintos estudios de esta tesis, realizando dos ensayos independientes. Los resultados obtenidos en el primer ensayo sugieren que los ratones SPL+/- alcanzan una mayor recuperación motora que los ratones WT. Las diferencias motoras fueron claramente significativas en el test de cilindro rotatorio (rotarod) y en la escala "SubScore" del test de campo abierto BMS

²⁸FTY720: análogo estructural de la S1P capaz de actuar sobre cuatro de los cinco receptores de membrana específicos de este esfingolípido.

pero menos evidentes en el “Score” del BMS. No obstante, mientras que la mayoría de los ratones silvestres analizados no recuperaron la capacidad para coordinar los movimientos de sus miembros anteriores y posteriores (“Score” ≤ 5), todos los ratones transgénicos deficientes en *Sgpl1* recuperaron la coordinación, alcanzando “Scores” de 8 en algún momento de las ocho semanas de duración del ensayo. La capacidad de coordinación entre los miembros anteriores y posteriores es uno de los hitos principales en la recuperación funcional, que raramente se alcanzan en ratones de la cepa C57BL/6J tras una contusión moderada (Basso *et al.*, 2006). En cuadrúpedos, la capacidad de coordinación depende de la preservación de las redes locales de interneuronas propioespinales, las cuales conectan los circuitos cervical-espinal y lumbosacral que forman los generadores centrales de pauta (central pattern generators, CPGs) responsables de los patrones rítmicos necesarios para la función motora de las extremidades anteriores y posteriores (Flynn *et al.*, 2011; Reigada *et al.*, 2015). Coherentemente con la preservación de estos circuitos propioespinales, la recuperación de la coordinación en ratones SPL+/- está acompañada de una mayor preservación tisular y de una mayor supervivencia de neuronas y oligodendrocitos, sugiriendo que la inhibición de la expresión de *Sgpl1* promueve la supervivencia de neuronas y oligodendrocitos a nivel espinal favoreciendo la recuperación funcional. Además, los ratones SPL+/- en este primer ensayo también tienden a presentar una menor abundancia de astrocitos reactivos, tanto en el epicentro como las regiones rostrales y caudales próximas a la lesión. Aunque la reactividad glial tiene efectos beneficiosos (Okada *et al.*, 2006; Pekny & Pekna, 2014), los astrocitos reactivos secretan diferentes proteoglicanos (por ejemplo, condroitin-sulfatos) que modifican la matriz extracelular e inhiben la regeneración axonal (Bovolenta *et al.*, 1992). Por inferencia, la menor reactividad astrogliar observada en la médula espinal de los ratones SPL+/- podría conducir a condiciones menos restrictivas para la regeneración tras la lesión medular, lo que podría contribuir a la recuperación funcional a medio-largo plazo. Coherentemente con una menor reactividad glial, los ratones deficientes en *Sgpl1* analizados en este primer ensayo también tienden a presentar menos células microgliales/macrófagos²⁹ en zonas próximas a la lesión medular que los ratones silvestres aunque, curiosamente, esta tendencia se invierte en el epicentro del trauma. Habida cuenta de que, según estudios previos, los macrófagos provenientes de monocitos se localizan preferentemente en el epicentro de la lesión (Zhou *et al.*, 2014) mientras que la microglía activada predomina en las proximidades del área dañada por la lesión medular, los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de *Sgpl1* reduce específicamente la abundancia de células microgliales. Por otra parte, dado que la proliferación y activación de la microglía y de los astrocitos supone una parte fundamental de la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central (Hausmann, 2003), el descenso tanto de la abundancia de microglía como la menor reactividad astrogliar observada sugieren que los ratones deficientes en *Sgpl1* desarrollan una menor respuesta inflamatoria que los animales silvestres, aportando un posible mecanismo promotor de la supervivencia de neuronas y oligodendrocitos (Greenhalgh & David, 2014). Sin embargo, sería necesario desarrollar estudios específicos en detalle para contrastar esta posibilidad así como para evaluar otros posibles mecanismos citoprotectores.

Los estudios de locomoción de este primer ensayo también arrojan otro resultado interesante como son las oscilaciones de los valores de “Score” en las evaluaciones semanales realizadas en los ratones SPL+/- . A lo largo del ensayo observamos que muchos animales capaces de realizar transectos coordinados una semana, no repetían este comportamiento la semana siguiente. Según nuestras observaciones, esta falta de reproducibilidad del comportamiento estaba asociada, principalmente,

²⁹El anticuerpo isolectina IB4, empleado para la identificación de microglía, también tiñe macrófagos.

a la reticencia de los ratones transgénicos a moverse, lo cual podría evidenciar síntomas de dolor. En este aspecto, es necesario señalar que la S1P modula procesos nociceptivos en médula espinal (Coste *et al.*, 2008), motivo por el cual decidimos incluir evaluaciones de hiperalgesia, tanto a estímulos mecánicos como térmicos, entre los análisis del primer ensayo. Coherentemente con un posible aumento de dolor, los resultados obtenidos sugieren que la sensibilidad al frío en las extremidades posteriores es más acentuada en ratones SPL+/- que en ratones WT. No obstante, esta tendencia no se observa en respuesta a estímulos de calor ni a estímulos mecánicos. En general, la elevada variabilidad obtenida en las evaluaciones sensitivas plantea serias dudas sobre la representatividad de los resultados, imposibilitando concluir si la deficiencia génica de *Sgpl1* induce cambios en los umbrales de sensibilidad. Este problema no es específico de los estudios realizados en este apartado sino que, en general, la aplicación de test sensitivos en modelos de lesión medular en ratones resulta compleja y está poco extendida en comparación con los modelos en rata (Hoschouer, 2010). En el test de Von Frey, la variabilidad en las estimaciones podría deberse al propio método (*up-down*) empleado, ya que la estimulación repetida varía el umbral de sensibilidad y este método requiere de 4 a 9 estímulos por ensayo (Chaplan *et al.*, 1994). Para reducir la variabilidad debido a esta estimulación reiterada y reducir el estrés de los animales, Bonin y colaboradores han propuesto recientemente un método alternativo (*Simplified up-down method*: SUDO) basado en la aplicación de únicamente cinco estímulos, con resultados comparables a los obtenidos mediante el método descrito por Chaplan (Bonin *et al.*, 2014). En vista de estas evidencias, podría resultar interesante replicar los ensayos de nocicepción mecánica en ratones SPL+/- empleando métodos alternativos al de Chaplan, como el método SUDO, que minimicen las diferencias debidas a estimulaciones repetidas favoreciendo condiciones más apropiadas para la comparación entre medidas y animales.

En conjunto, los resultados del primer ensayo parecen respaldar el efecto beneficioso de la inhibición génica de *Sgpl1* en el modelo de lesión medular empleado y, por tanto, apoyar la hipótesis planteada de que la modulación de *Sgpl1* es una estrategia terapéutica en el tratamiento de la lesión medular. Sin embargo, contrariamente a esta hipótesis, el segundo ensayo a largo plazo no reveló diferencias relevantes dependientes del genotipo. Aunque en las evaluaciones motoras varios animales SPL+/- alcanzan la coordinación entre miembros, las diferencias son mucho menores que en el experimento anterior e inexistentes tanto en el "*Subscore*" como en los valores del test de Rotarod o en la preservación tisular. Como consecuencia, los resultados de este segundo experimento parecen descartar los efectos beneficiosos de la inhibición génica de *Sgpl1*. La falta de coherencia entre los dos experimentos realizados podría ser fruto del azar, es decir, ser consecuencia de que los ratones transgénicos seleccionados en los dos ensayos representen casos extremos de una misma población, lo que implicaría que la modulación de la *Sgpl1* podría tener efectos intermedios entre los observados en el primer ensayo y la ausencia de efectos observada en el segundo ensayo. Alternativamente, esta falta de coherencia entre ensayos podría responder a inconsistencias en los efectos de la inhibición génica a nivel molecular. De hecho, a lo largo de estos estudios hemos apreciado marcadas incoherencias en los niveles de ARNm de *Sgpl1* ya que, mientras en los ensayos iniciales comprobamos que su expresión génica era significativamente menor en los órganos analizados de los ratones SPL+/- que en los de ratones WT, en los posteriores ensayos a corto plazo no se reprodujeron tales diferencias. Estas incoherencias podrían indicar la existencia de algún problema en la colonia de ratones transgénicos a la hora de presentar el fenotipo esperado. Además, resulta

llamativo que, aunque los niveles de expresión génica y de actividad enzimática en ratones SPL+/- son similares a los observados en ratones silvestres, la expresión proteica de SPL en la médula espinal sin lesionar resulta notablemente mayor en los ratones SPL+/- que en los ratones silvestres.

La falta de efecto de la inhibición génica de Sgpl1 también es apreciable en los niveles de S1P en la médula espinal, tanto en animales control como en lesionados. Considerando estudios previos, nuestros resultados no son completamente inesperados ya que la expresión (y actividad enzimática) de SPL en el cerebro no es tan elevada como en otros órganos y, además, se encuentra restringida a determinados tipos neuronales (Allende *et al.*, 2011; Borowsky *et al.*, 2012). En neuronas granulares del cerebelo, estudios previos han constatado que únicamente se produce un aumento de la concentración de S1P cuando la inhibición de Sgpl1 es completa (SPL-/-) mientras que, en neuronas SPL+/-, la concentración de S1P es similar a la observada en ratones silvestres (Hagen *et al.*, 2009). Algo similar ocurre en los ratones transgénicos inducibles donde se ha observado que la delección de Sgpl1 no tiene efectos claros sobre la expresión génica, la actividad enzimática de SPL o la concentración de S1P en cerebro (Billich *et al.*, 2013). En este caso, los autores ponen de manifiesto que la falta de efectos en el sistema nervioso central en su modelo podría deberse a la escasa penetración del tamoxifen a través de la barrera hematoencefálica ya que, mientras que en otros órganos la inhibición ronda el 70-90%, en cerebro es únicamente de un 40% (Billich *et al.*, 2013). Así pues, nuestros resultados aunque decepcionantes, resultan coherentes tanto con la falta de efecto tras una delección génica del 40% en cerebro como con los mínimos efectos observados en neuronas de animales heterocigóticos Sgpl1+/-.

Además de constatar la falta de efecto de la inhibición parcial de Sgpl1 sobre la concentración de S1P en la médula espinal, los análisis de esfingolipidómica también han permitido constatar que en ratones SPL+/-, como observamos en ratones silvestres y discutimos detalladamente en el segundo apartado de esta tesis, la concentración de S1P en la médula espinal varía tras la LME de manera paralela a la actividad enzimática de SPL y, además, mantiene una fuerte relación ($R^2=0,974$) con la concentración de Sph. Interesantemente, nuestros resultados demuestran que la relación S1P/Sph difiere significativamente dependiendo del genotipo, quizás en respuesta a la deficiencia génica de Sgpl1. En este punto resulta apropiado recordar que, al evaluar los cambios lipidómicos en ratones silvestres (capítulo 1), observamos que la relación S1P/Sph se pierde a 3dpo y sugerimos que la SPL podría participar en ese desajuste. De acuerdo con esta hipótesis, es posible que cambios que estén ocurriendo puntualmente a 3dpo sean los responsables de la mayor recuperación motora de los ratones SPL+/- observada en el primer ensayo, si bien es cierto que, considerando la falta de cambios moleculares observados en estos estudios, parece poco probable que a 3dpo la inhibición de expresión de Sgpl1 resulte crítica en estos ratones transgénicos.

El análisis lipidómico también ha permitido observar que, curiosamente, la concentración total de algunas familias de esfingolípidos difiere de manera significativa (v.g.: dhCer, Cer o GluCer) entre ratones SPL+/- y ratones WT, a pesar de que las concentraciones de Sph y de S1P se mantienen similares. Estos cambios podrían deberse a participación de la ruta de reciclaje de los esfingolípidos, o *salvage pathway*, en la que la re-acilación de la Sph da lugar a la formación de ceramidas (Kitatani & Luberto, 2010). Coherentemente con esta posibilidad, nuestros resultados demuestran que en ratones SPL+/- la concentración total de ceramidas, esfingomielinas y glucosílceraidas es mayor

que en ratones silvestres. El conjunto de estas evidencias podría señalar que, en ratones deficientes de Sgpl1, la ausencia de acumulación de S1P podría deberse a su conversión a otros esfingolípidos más complejos a través de la ruta de reciclaje si bien es cierto que nuestros resultados únicamente permiten hipotetizar esta posibilidad.

Descartada la implicación directa de los efectos de la inhibición génica de Sgpl1 sobre el sistema nervioso central, y más concretamente sobre la médula espinal, en las mejoras motoras tras la LME observadas en el primer ensayo, el efecto de la S1P sobre el sistema inmune (Allende *et al.*, 2011; Billich *et al.*, 2013) supone una explicación alternativa plausible. Para evaluar esta posibilidad, analizamos los cambios de expresión génica, proteica y actividad enzimática de SPL en el timo, un órgano fundamental en la maduración de las células inmunes (Janeway *et al.*, 2001) y que, además, presenta una elevada expresión de SPL (Borowsky *et al.*, 2012). A diferencia de estudios previos, nuestros resultados tampoco muestran que la inhibición de Sgpl1 tenga claros efectos sobre el timo. En este sentido, a pesar de que en los ensayos iniciales a este estudio la expresión génica de Sgpl1 era significativamente diferente dependiendo del genotipo, al igual que en el caso de médula espinal, estos resultados no fueron reproducidos posteriormente. La expresión proteica y la actividad de SPL fueron igualmente similares entre ratones silvestres y transgénicos y aunque, a 7dpo, la expresión de SPL podría sugerir una tendencia a incrementar su expresión en ratones SPL+/-, el reducido número de datos disponibles no permite postular estas diferencias como reales, siendo necesario incrementar el número de observaciones. Independientemente de las razones subyacentes a la falta de efecto de la inhibición de Sgpl1 sobre el timo, los resultados indican que las mejoras observadas en el Exp. I tampoco se deben a efectos sobre el sistema inmune. No obstante cabe destacar que la ausencia de efecto de la inhibición de Sgpl1 en ratones transgénicos control supone un resultado bastante desconcertante e inesperado. La falta de coherencia entre los fenotipos esperados y los observados no es única del modelo empleado, sino que ha sido puesta de manifiesto en diferentes modelos de patologías neurodegenerativas, pero resulta particularmente sorprendente en modelos transgénicos que, como en el caso de la presente tesis, han sido creados mutando los genes codificantes de la proteína diana (Kreiner, 2015). No obstante, la inhibición génica de Sgpl1 en timo supone un testigo habitual en este tipo de ratones transgénicos (Billich *et al.*, 2013; Schwab *et al.*, 2005b), por lo que la ausencia de efectos en nuestro modelo resulta incoherente con estudios previos y sugiere que la modificación genética incluida en la colonia de animales transgénicos empleada en estos estudios pudo estar comprometida. De hecho, resulta llamativo que, durante todo el tiempo en el que se mantuvo la colonia de ratones, no conseguimos identificar ningún animal homocigoto SPL-/-, a pesar de que numerosos estudios han demostrado la viabilidad de estos ratones durante el periodo de lactancia (Vogel *et al.*, 2009). Y aún resulta más sorprendente que ni siquiera fuese posible detectar este tipo de transgénicos en ratones recién nacidos (P0) destinados a otros ensayos ni entre los animales muertos sin justificación aparente durante el periodo de lactancia.

En conjunto, la falta de reproducibilidad en los ensayos funcionales y moleculares realizados pone de manifiesto la importancia de la replicación experimental para obtener resultados robustos. En este sentido, numerosos investigadores han señalado que la incapacidad para trasladar los resultados básicos a la investigación clínica puede deberse, entre otras cosas, a la falta de replicaciones independientes que garanticen resultados robustos durante la fase de investigación básica/pre-clínica (Drucker & Krapfenbauer, 2013). Teniendo en cuenta las incongruencias observadas, no podemos

descartar algún tipo de anomalía en la cepa de ratones transgénicos empleada en estos estudios, por lo que resultaría interesante evaluar el efecto de la inhibición de Sgpl1 empleando otros mutantes de Sgpl1, ya sean constitutivos o inducibles. No obstante, considerando la falta de coherencia en los niveles de ARNm, proteína y actividad enzimática de SPL observada a lo largo de esta tesis y en estudios previos de otros autores (Gorshkova *et al.*, 2012), así como la aparente dificultad para inducir cambios coherentes en el sistema nervioso central mediante el uso de ratones transgénicos, estos animales podrían no garantizar la reducción de los niveles de expresión y actividad enzimática de SPL, ni el aumento esperable de S1P. Alternativamente, se podría evaluar la viabilidad de SPL como tratamiento para la lesión medular empleando inhibidores farmacológicos que permitan una modulación directa de la actividad SPL. Esta aproximación resultaría particularmente interesante ya que permitiría testar los efectos de la modulación a diferentes tiempos y con diferentes condiciones (por ejemplo, comparando tratamientos puntuales y prolongados) y además, el uso de fármacos para tratamiento de distintas patologías supone una de las herramientas más ampliamente utilizadas en el ámbito clínico.

CAPÍTULO IV

Nuevos inhibidores farmacológicos de la esfingosina-1-fosfato liasa

INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados en la presente tesis han demostrado que tanto la expresión (génica y proteica) como la actividad enzimática de SPL varían en la primera semana tras la LME, sugiriendo que su modulación puede ser una potencial estrategia en el tratamiento de la lesión medular. Desafortunadamente, los estudios realizados en el apartado precedente empleando ratones con inhibición parcial génica de la Sgpl1 no permitieron obtener resultados concluyentes al respecto. En el presente apartado, nos planteamos un abordaje alternativo basado en la inhibición farmacológica de la actividad enzimática que, además, permite una aproximación más directa de los efectos de la inhibición de la SPL. Hasta la fecha, se han descrito varios inhibidores de la actividad de SPL como, por ejemplo, la 4-desoxipiridoxina (DOP), el 2-acetil-4-tetrahidroxibutilimidazol (THI), la C8-ciclopropenilceramida (GT11) o la 2-vinilesfinganina-1-fosfato (2VS1P). Sin embargo, estos compuestos presentan serias limitaciones, sea por una inhibición insuficiente de SPL o por una inespecificidad y toxicidad elevadas, que dificultan su utilización en sistemas biológicos. Por ello, el equipo de investigación del laboratorio de Neuroprotección Molecular (Hospital Nacional de Parapléjicos), donde se desarrolló esta tesis, inició una colaboración con investigadores de Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC, CSIC) para desarrollar y testar compuestos orgánicos de nueva síntesis como inhibidores de la actividad enzimática de SPL. Este proyecto comenzó por la realización de una criba masiva *in silico* de potenciales inhibidores de la SPL basados en estudios de “*docking*”³⁰ empleando la estructura tridimensional de la proteína SPL bacteriana. Adicionalmente, se desarrolló una segunda aproximación basada en los mecanismos enzimáticos descritos en la acción de la SPL. Como resultado de estos ensayos, el equipo responsable de la síntesis de los inhibidores identificó una serie de compuestos sintéticos de los que, tras una evaluación de la viabilidad de síntesis, los costes y la disponibilidad, se seleccionaron finalmente siete compuestos como candidatos óptimos para su análisis en modelos biológicos (Tabla R4.1). El objetivo principal del presente apartado es, pues, testar la eficacia de estos siete inhibidores de nueva síntesis en la modulación de SPL y evaluar su uso como potencial estrategia citoprotectora en células neurales.

Para alcanzar este objetivo, inicialmente, determinamos la concentración media inhibitoria (IC₅₀) así como la citotoxicidad de los siete inhibidores seleccionados, empleando células de neuroblastoma de ratón (Neuro2a; N2a). Esta línea celular es un modelo *in vitro* para evaluar los efectos neurotóxicos de nuevos compuestos debido a su origen neuronal. Además, la actividad enzimática de SPL en células N2a ya ha sido estudiada en apartados precedentes de esta tesis y presenta niveles óptimos para evaluar los cambios de actividad inducidos por los inhibidores seleccionados. Por otro lado, y con el fin de replicar *in vitro* unas condiciones de análisis lo más similares posible a las condiciones fisiológicas, evaluamos de forma preliminar tanto la estabilidad de la actividad inhibitoria de varios de estos compuestos en presencia de fosfatasas, como su permeabilidad en células intactas. En tercer lugar, evaluamos los efectos citoprotectores de la inhibición de SPL, analizando la supervivencia celular ante un estímulo pro-apoptótico en presencia y ausencia del inhibidor más eficaz (menor IC₅₀) en diferentes regímenes de administración. Por último, llevamos a cabo unas primeras aproximaciones *in vivo* destinadas a evaluar la efectividad de los compuestos con mejores propiedades (menores IC₅₀ y citotoxicidad) en la inhibición de la actividad enzimática de SPL en médula espinal y timo. Toda la información referente a la metodología empleada en el presente apartado se encuentra descrita en la sección correspondiente de materiales y métodos.

³⁰**Docking:** método para predecir la orientación preferente de una molécula al unirse a otra para formar un complejo estable (Meng *et al.*, 2011).

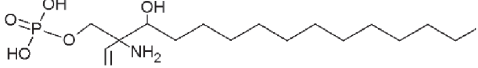
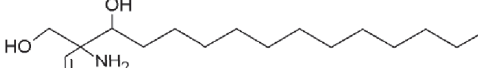
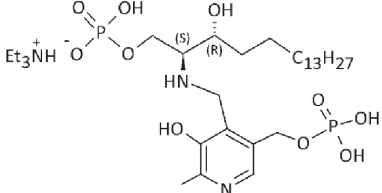
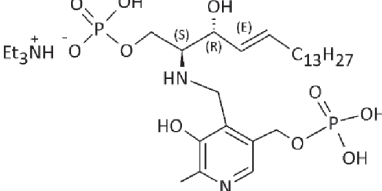
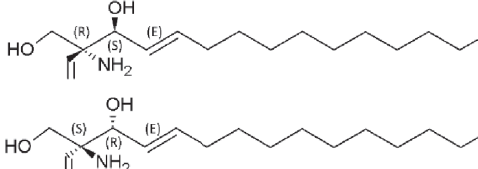
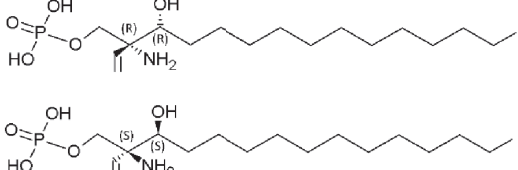
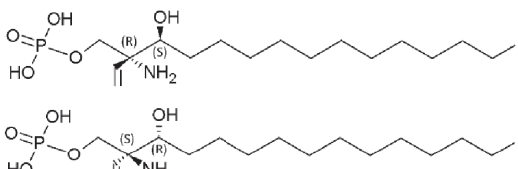
Nombre	Estructura Molecular	P.M.(g/mol)	Disolvente
1ª síntesis			
RBM-6.24		365,45	DMSO
RBM-6.31		285,47	DMSO
RBM-7.12		713,82	H ₂ O
RBM-7.32		711,82	H ₂ O
2ª síntesis			
JG-1		283,45	DMSO
RX-115		365,45	DMSO
RX-116		365,45	DMSO

Tabla R4.1. Compuestos inhibidores de la actividad SPL analizados. La tabla muestra los siete inhibidores de nueva síntesis empleados en los estudios de este apartado. El inhibidor RBM-6.24 es una mezcla de los cuatro estereoisómeros de la estructura. Los inhibidores RX-115 y RX-116 son las mezclas enantioméricas del inhibidor RBM-6.24.

RESULTADOS

RBM-7.32 Y RX-116: LOS INHIBIDORES MÁS EFICACES Y MENOS TÓXICOS

Para evaluar la eficacia de los distintos compuestos en la inhibición de la actividad enzimática de SPL en células neurales, determinamos su concentración media inhibitoria (IC_{50}) en cultivos de la línea celular N2a. Antes de realizar estos análisis, procedimos a realizar una serie de ensayos de puesta a punto destinados a establecer la concentración óptima de proteína total de los extractos celulares de N2a para realizar los ensayos de actividad. Adicionalmente, completamos esta puesta a punto evaluando paralelamente si la adición de PLP (cofactor) exógeno condiciona los valores de actividad enzimática estimada para los extractos de células N2a. Los datos obtenidos en estos ensayos se muestran en el material suplementario de esta sección (Sup.Mat.26; Pág. 316). Como ilustra la Figura R4.1.A y B, la actividad de SPL aumenta con la concentración de proteína, manteniendo una relación prácticamente lineal en todo el rango de concentraciones analizado, tanto en presencia como en ausencia del cofactor PLP ($R^2=0,987$ y $R^2=0,998$, respectivamente). Además, los resultados obtenidos revelan que la actividad SPL en los extractos de células N2a aumenta de forma significativa cuando se suplementa la reacción con PLP, demostrando que la disponibilidad de este cofactor condiciona la actividad SPL en estos extractos celulares (Figura R4.1.C). Considerando estos resultados decidimos, por una parte, establecer 2,5mg/mL como la concentración óptima de proteína total para estos ensayos debido a que se encuentra en el rango lineal de la relación entre concentración proteica y actividad de SPL y, además, no resulta limitante en relación a la cantidad de muestra disponible. Por otra parte, decidimos llevar a cabo los ensayos de actividad SPL suplementando la reacción con el cofactor PLP debido al notable incremento de actividad observado en las muestras analizadas en presencia de este suplemento en relación a los análisis sin suplementar.

Una vez establecidos los parámetros óptimos de medición de la actividad de SPL en extractos de células N2a, evaluamos la efectividad de inhibición de los siete compuestos seleccionados. Para ello, analizamos la actividad de SPL a distintas concentraciones de inhibidor, determinando la concentración a la que cada inhibidor induce una reducción del 50% de la actividad SPL (IC_{50} absoluto *sensu* Sebaugh, 2011). Los datos brutos obtenidos tras las incubaciones a distintas concentraciones de inhibidor se muestran en el material suplementario de esta sección (Sup.Mat.27 A y B; Pág. 317). Para el cálculo del IC_{50} , establecimos los valores de actividad SPL máximo y mínimo, considerando el máximo de actividad (0% de inhibición) como el promedio de la actividad registrada en extractos celulares en ausencia de inhibidor (Control) y la mínima actividad (100% inhibición) como el promedio de los valores de actividad obtenidos en muestras sin extracto proteico (Blanco). Una vez fijados los umbrales superior e inferior, ajustamos los datos de actividad SPL y concentración de cada inhibidor a una función sigmoide y empleamos la ecuación resultante para determinar el IC_{50} . Los resultados obtenidos (Tabla R4.2 y Figura R4.2) demuestran que los compuestos más eficaces en la inhibición de la actividad de SPL en extractos celulares de N2a son RX-116 ($IC_{50}=6\mu M$), RBM-7.12 ($IC_{50}=11,75\mu M$) y RBM-7.32 ($IC_{50}=13,68\mu M$) (Tabla R4.3). Los demás inhibidores presentan concentraciones de IC_{50} claramente superiores, especialmente en el caso del inhibidor RBM-6.31 ($IC_{50}=2,79mM$), por lo que su efectividad inhibitoria es menor que para los compuestos anteriormente mencionados.

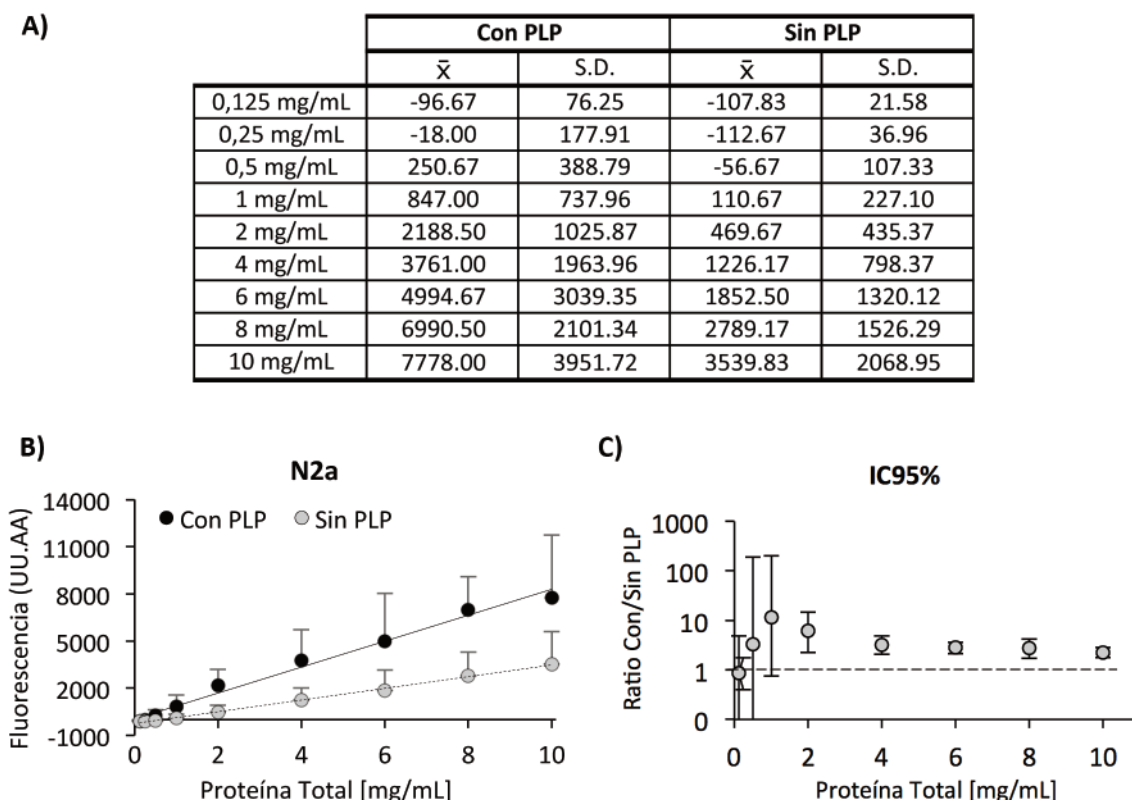


Figura R4.1. Actividad SPL a diferentes concentraciones de proteína en extractos de células N2a. A) La tabla recoge los valores de actividad de SPL (medida como fluorescencia; UU.AA) a distintas concentraciones de proteína en extractos celulares de N2a, tanto en presencia como en ausencia de PLP. Los valores mostrados corresponden al promedio de tres cultivos independientes con dos replicaciones técnicas cada uno. En el cálculo de estos valores se ha sustraído la señal inespecífica (correspondiente al blanco de cada experimento). B) La gráfica ilustra los valores recogidos en la tabla A. Como se puede apreciar, la relación entre la concentración y la actividad SPL es prácticamente lineal en todo el intervalo analizado. C) La gráfica ilustra los intervalos de confianza al 95% de la tasa comparando los valores de actividad SPL en muestras con y sin PLP a diferentes concentraciones. La tasa está calculada como la medida de fluorescencia en presencia de PLP dividida por la medida de fluorescencia en ausencia de PLP para cada concentración analizada. PLP=piridoxal-5'-fosfato. \bar{X} =promedio; S.D.=desviación estándar.

Determinada la efectividad inhibitoria en extractos celulares de N2a, decidimos evaluar si estos compuestos inducen efectos tóxicos que puedan comprometer la viabilidad celular. Para ello, analizamos mediante ensayos de MTT la viabilidad de cultivos de células N2a tratados durante 24, 48 y 72h con distintas concentraciones de cada inhibidor (de 10 a 80 μ M). Los cultivos destinados a ensayos con 72h de incubación fueron sembrados a una densidad inicial de 5.000 células/pocillo para evitar procesos de muerte celular por superpoblación debido a la proliferación celular, mientras que para los ensayos con incubaciones de 24 y 48h, empleamos cultivos con una densidad celular entre 5.000-10.000 células/pocillo. Los datos obtenidos en estos análisis se muestran en detalle en el material suplementario correspondiente (Sup.Mat.28; Pág. 319) y de manera resumida en la Tabla R4.4. Los análisis de estos datos muestran importantes diferencias de toxicidad entre los inhibidores. Así, el inhibidor RBM-7.32 apenas reduce la viabilidad celular en todas las condiciones testadas (Figura R4.3), lo que sugiere que este compuesto es el que menor efecto citotóxico induce sobre cultivos

	RBM 6:24		RBM 6:31		RBM 7:12		RBM 7:32		JG-1	RX-115	RX-116
	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. III	Exp. III
Control*	5924	7134	5924	7134	6628	8108	6628	8108	36663	36663	36663
	5663	7229	5663	7229	6589	8078	6589	8078	36907	36907	36907
	6216	7286	6216	7286	10945	8116	10945	8116	36397	36397	36397
15,62 μ M	4252	6305	5211	7365	3707	5087	4354	5099	31316	29502	20564
	4426	6128	5301	7266	3869	5357	4430	5009	31338	29187	18354
	4335	6091	4695	7371	4329	5521	4238	5145	31029	29240	20491
31,25 μ M	3988	5348	4982	7319	3459	4477	3697	4393	27751	23071	16750
	3734	5362	4866	7230	3468	4241	3687	4405	27281	22582	16622
	3272	5323	4749	7295	3949	4686	3757	4470	27210	23771	16941
62,5 μ M	3374	4149	5100	7360	2777	3604	3064	3626	21631	18386	13446
	3181	4128	5365	7108	2703	3388	3305	3635	21330	18767	13565
	3227	4072	5117	7181	2706	3403	3065	3699	21462	18685	13158
125 μ M	2560	3280	5359	7132	1979	2635	2509	2967	15071	13935	11386
	1731	3238	5263	7019	1999	2611	2711	2970	14757	14732	11815
	2495	3216	4855	7000	2076	2654	2765	3025	14613	13890	11182
250 μ M	1757	2601	5545	7163	1738	2351	1860	2738	11479	10822	9721
	1246	2271	5516	6857	1578	2383	1951	2506	11066	10713	9611
	1669	2454	4836	6972	1674	2419	1991	2485	11102	10955	9621
Blanco	1425	3024	1425	3024	1425	3024	1425	3024	13232	13232	13232
	1435	2886	1435	2886	1435	2886	1435	2886	11653	11653	11653
	1320	3006	1320	3006	1320	3006	1320	3006	11875	11875	11875

Tabla R4.2. Determinación del IC₅₀: actividad SPL en extractos de células N2a tratados con diferentes concentraciones de inhibidor. La tabla muestra los valores de fluorescencia a distintas concentraciones de inhibidor en extractos de N2a a una concentración de 2,5mg de proteína total/mL. Los datos señalados como "Control*" se refieren a extractos celulares tratados con el vehículo correspondiente pero en ausencia del inhibidor. Los valores de las muestras "Blanco" corresponden a muestras sin extracto proteico.

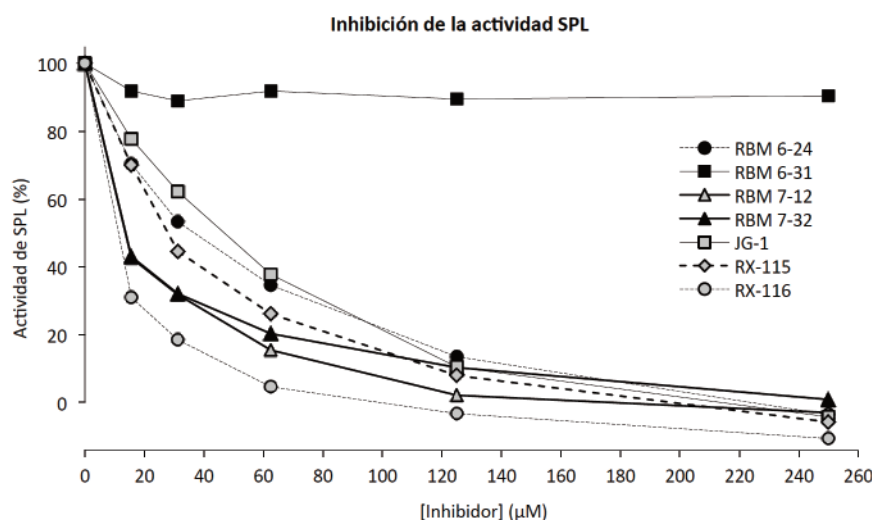


Figura R4.2. Efecto de los inhibidores sobre la actividad SPL. La gráfica ilustra la actividad enzimática de SPL en extractos celulares de N2a tras su incubación (1 hora) con distintas concentraciones de los distintos inhibidores testados.

celulares de N2a. Algo similar ocurre para el compuesto RBM-6.24 y, consecuentemente, para los inhibidores RX-115 y RX-116 (Figura R4.3), resultantes de la separación enantiomérica de los cuatro estereoisómeros que conforman el inhibidor RBM-6.24. Por el contrario, los inhibidores RBM-7.12 y JG-1 causan un fuerte descenso de la viabilidad celular (Figura R4.3), especialmente en el caso del inhibidor JG-1 que, a la concentración correspondiente a su IC₅₀, causa un descenso de los valores de MTT de aproximadamente el 50% en las primeras 24h de incubación.

	RBM 6-24		RBM 6-31		RBM 7-12	
	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II
IC ₅₀	31,97	29,19	753,2	4823	12,54	10,95
IC _{95%}	25,95-39,38	20,26-42,06	352,6-1609	2582-9011	10,71-14,68	7,64-15,70
Media	30,58		2788,1		11,745	
	RBM 7-32		JG-1	RX-115	RX-116	
	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. III	Exp. III	
IC ₅₀	16,56	10,8	36,31	23,89	5,997	
IC _{95%}	13,89-19,74	8,68-13,44	26,82-49,17	18,39-31,03	4,14-8,70	
Media	13,68		36,31	23,89	5,997	

Tabla R4.3. IC₅₀ de los inhibidores de SPL analizados. La tabla recoge los valores estimados de IC₅₀ (μM) de los distintos inhibidores en los extractos de células N2a (2,5mg de proteína total/mL) para cada experimento realizado (Exp.). IC_{95%}= intervalo de confianza del 95% para el valor del IC₅₀. Media= promedio del IC₅₀ calculado para cada inhibidor en los distintos experimentos.

		24h			48h			72h		
		\bar{x}	S.D.	n	\bar{x}	S.D.	n	\bar{x}	S.D.	n
RBM-6.24	Control	1	0	3	1	0	3	1	0	2
	10μM	0,959	0,082		1,069	0,129		0,964	0,074	
	20μM	1,012	0,193		1,063	0,127		0,953	0,174	
	40μM	1,083	0,267		0,923	0,065		0,873	0,280	
	80μM	1,053	0,324		0,665	0,103		0,210	0,157	
RBM-7.12	Control	1	0	3	1	0	3	1	0	2
	10μM	0,931	0,046		0,669	0,075		0,603	0,289	
	20μM	0,787	0,118		0,234	0,105		0,139	0,002	
	40μM	0,349	0,275		0,112	0,024		0,079	0,028	
	80μM	0,297	0,055		0,090	0,023		0,089	0,030	
RBM-7.32	Control	1	0	3	1	0	3	1	0	2
	10μM	0,974	0,040		0,761	0,064		0,915	0,132	
	20μM	0,896	0,072		0,674	0,082		0,818	0,003	
	40μM	0,907	0,049		0,631	0,110		0,867	0,040	
	80μM	0,985	0,097		0,658	0,254		0,739	0,080	
JG-1	Control	1	0	3	1	-	1	1	-	1
	10μM	0,690	0,344		0,640	-		0,494	-	
	20μM	0,539	0,338		0,609	-		0,237	-	
	40μM	0,274	0,333		0,340	-		0,109	-	
	80μM	0,145	0,120		0,185	-		0,080	-	
RX-115	Control	1	0	3	1	-	1	1	-	1
	10μM	0,684	0,217		0,963	-		0,664	-	
	20μM	0,757	0,258		0,721	-		0,511	-	
	40μM	0,738	0,246		0,642	-		0,213	-	
	80μM	0,578	0,173		0,349	-		0,092	-	
RX-116	Control	1	0	3	1	-	1	1	-	1
	10μM	0,788	0,293		0,989	-		0,985	-	
	20μM	0,788	0,308		0,827	-		0,586	-	
	40μM	0,684	0,249		0,653	-		0,106	-	
	80μM	0,524	0,453		0,240	-		0,082	-	

Tabla R4.4. Citotoxicidad de los inhibidores en células N2a. La tabla muestra los resultados de los análisis de la viabilidad celular de cultivos celulares de N2a incubados durante 24, 48 o 72h a diferentes concentraciones de inhibidor. Los valores mostrados corresponden a la absorbancia de los ensayos de MTT para cada condición normalizada respecto al valor correspondiente de la muestra sin inhibidor (Control). h= horas; \bar{x} = promedio de los resultados de los distintos ensayos; S.D.= desviación estándar; n= número de ensayos.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta sección demuestran que los compuestos con mayor eficiencia de inhibición y menor toxicidad son los inhibidores RX-116 y RBM-7.32, señalándolos como los candidatos más adecuados para su empleo en sistemas biológicos.

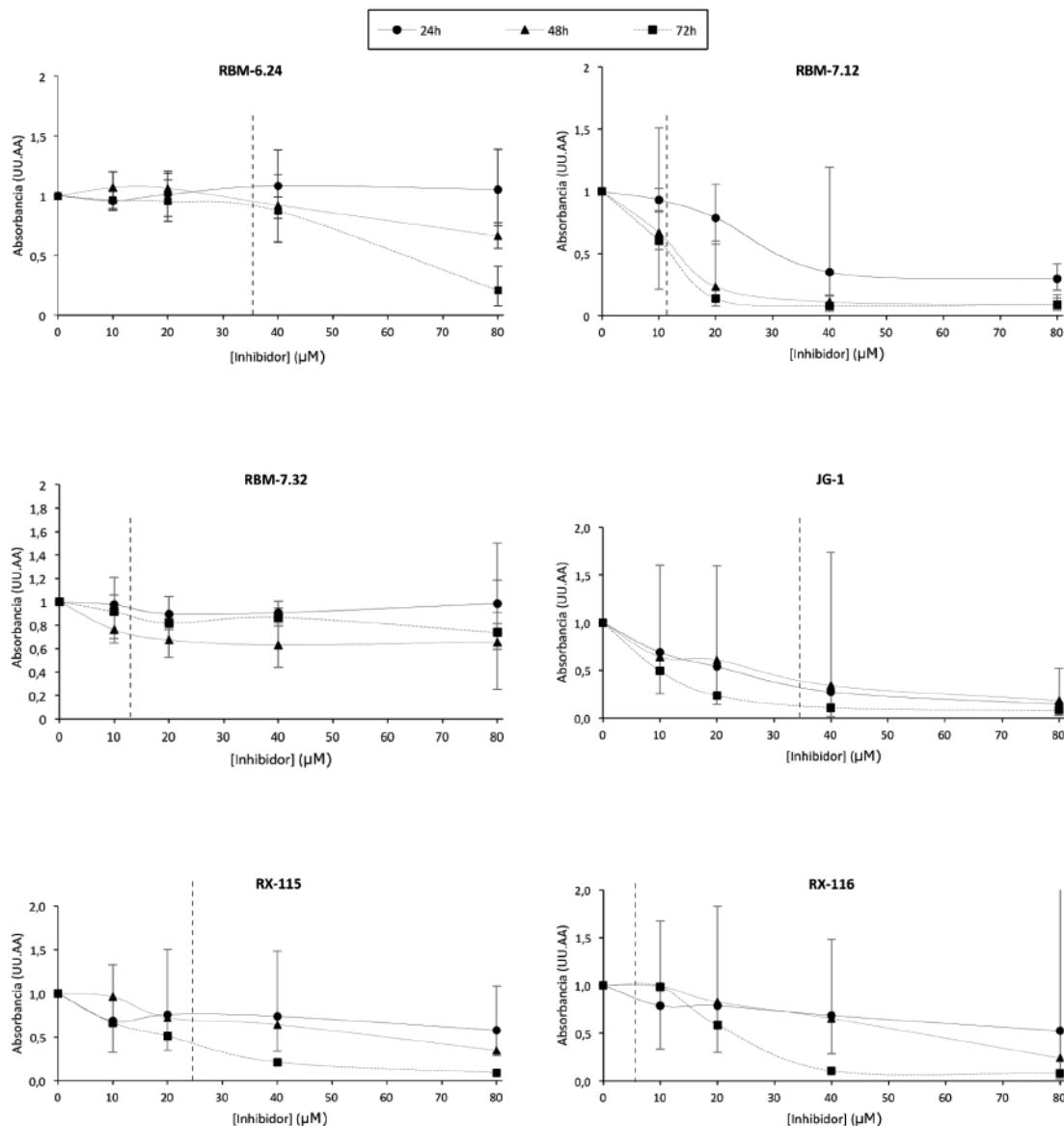


Figura R4.3. Citotoxicidad de los inhibidores en células N2a. Las gráficas muestran la viabilidad de células N2a tras incubarlo durante 24, 48 o 72h con cada uno de los inhibidores de $IC_{50} < 1\text{mM}$. Las líneas discontinuas verticales señalan la concentración IC_{50} de cada inhibidor.

RBM-6.24, RBM-7.12 Y RBM-7.32 INHIBEN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SPL EN CÉLULAS INTACTAS

Antes de valorar los efectos citoprotectores de los inhibidores, procedimos a evaluar su estabilidad en condiciones fisiológicas y su capacidad para penetrar en células intactas. A la hora de evaluar su estabilidad nos centramos en el efecto de las fosfatasa dado que, a excepción de RBM-6.31 y JG-1, todos los inhibidores seleccionados presentan, al menos un grupo fosfato en su estructura molecular, haciéndoles potenciales sustrato de las fosfatasa presentes en las células. Para evaluar los efectos de las fosfatasa presentes en las células sobre estos compuestos, calculamos los niveles de inhibición de la actividad SPL de los compuestos tras ser incubados en extractos celulares durante diferentes tiempos y los comparamos con los niveles de actividad del mismo compuesto incubado en idénticas condiciones pero en presencia de inhibidores de fosfatasa, con el fin de eliminar la actividad de estas enzimas. En estos ensayos decidimos no incluir los compuestos RBM-6.31 y JG-1 al carecer de grupos fosfatos susceptibles de la acción de las fosfatasa. Además, considerando que el inhibidor RBM-6.24 comprende los cuatro diastereoisómeros posibles de los dos carbonos quirales de su estructura molecular, decidimos excluir del análisis a sus mezclas racémicas RX-115 y RX-116 asumiendo que su estabilidad resulta equivalente a la del propio RBM-6.24. Así pues, para realizar este ensayo analizamos la actividad SPL en extractos celulares de N2a incubados durante 2, 6, 12, 24, 48 o 72

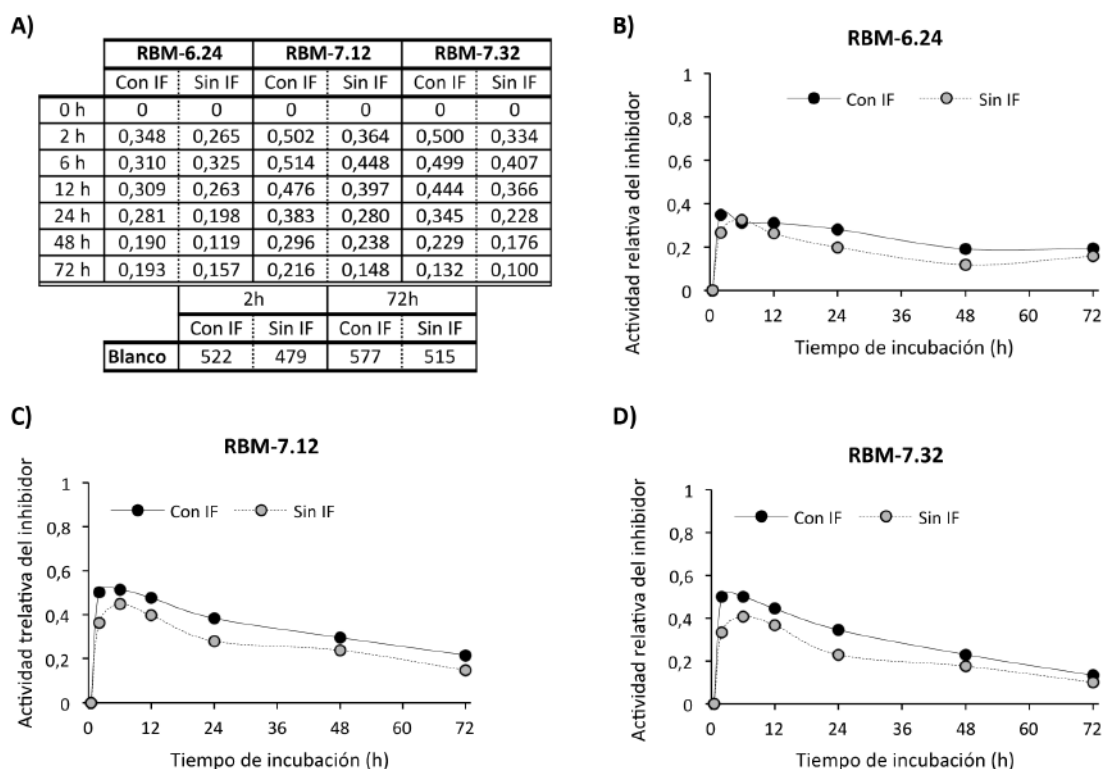


Figura R4.4. Estabilidad de la actividad inhibitoria de RBM-6.24, RBM-7.12 y RBM-7.32 en extractos celulares de N2a. La tabla (A) muestra los valores de actividad inhibitoria de RBM-6.24 (ilustrada en B), RBM-7.12 (ilustrada en C) y RBM-7.32 (ilustrada en D) tras incubarlos diferentes tiempos con extractos celulares de N2a (2,5mg/mL) en presencia (Con IF) o ausencia (Sin IF) de inhibidores de fosfatasa. La actividad inhibitoria se calculó como el valor complementario (1-X) de los valores de actividad SPL normalizados respecto a los controles positivos correspondiente. Además, se muestran los valores de las muestras sin extracto proteico (Blanco) utilizadas para evaluar la señal inespecífica del ensayo 2 y 72h. La comparación entre estos valores indica que la señal inespecífica del ensayo se mantiene prácticamente constante en las condiciones testadas. h= horas.

horas con 50 μ M RBM-6.24, 25 μ M RBM-7.12 o 25 μ M de RBM-7.32 y tratados o sin tratar con inhibidores de fosfatasa (25mM NaF y 25 μ M Na₃VO₄). Además, para cada tiempo de incubación, incluimos controles positivos compuestos por extractos celulares incubados con el vehículo correspondiente a cada inhibidor. Por último, y para descartar cambios en la señal inespecífica dependientes del tiempo de incubación analizamos la señal en muestras de tampón de extracción sin extracto celular (blanco) incubadas con o sin inhibidor de fosfatasa durante 2 o 72 horas. Los datos obtenidos en estos ensayos se muestran en detalle en el material suplementario correspondiente (Sup.Mat.28; Pág. 319). Los resultados obtenidos tras el análisis de estos datos demuestran que la actividad de las fosfatasa presentes en los extractos celulares causa un descenso en la actividad inhibitoria de RBM-6.24, RBM-7.12 y RBM-7.32 (Figura R4.4). Por otra parte, hemos observado que, interesantemente, la inhibición de la actividad SPL se reduce de forma continua con el tiempo de incubación en los compuestos RBM-7.12 y RBM-7.32 y de manera más sutil en el caso de RBM-6.24.

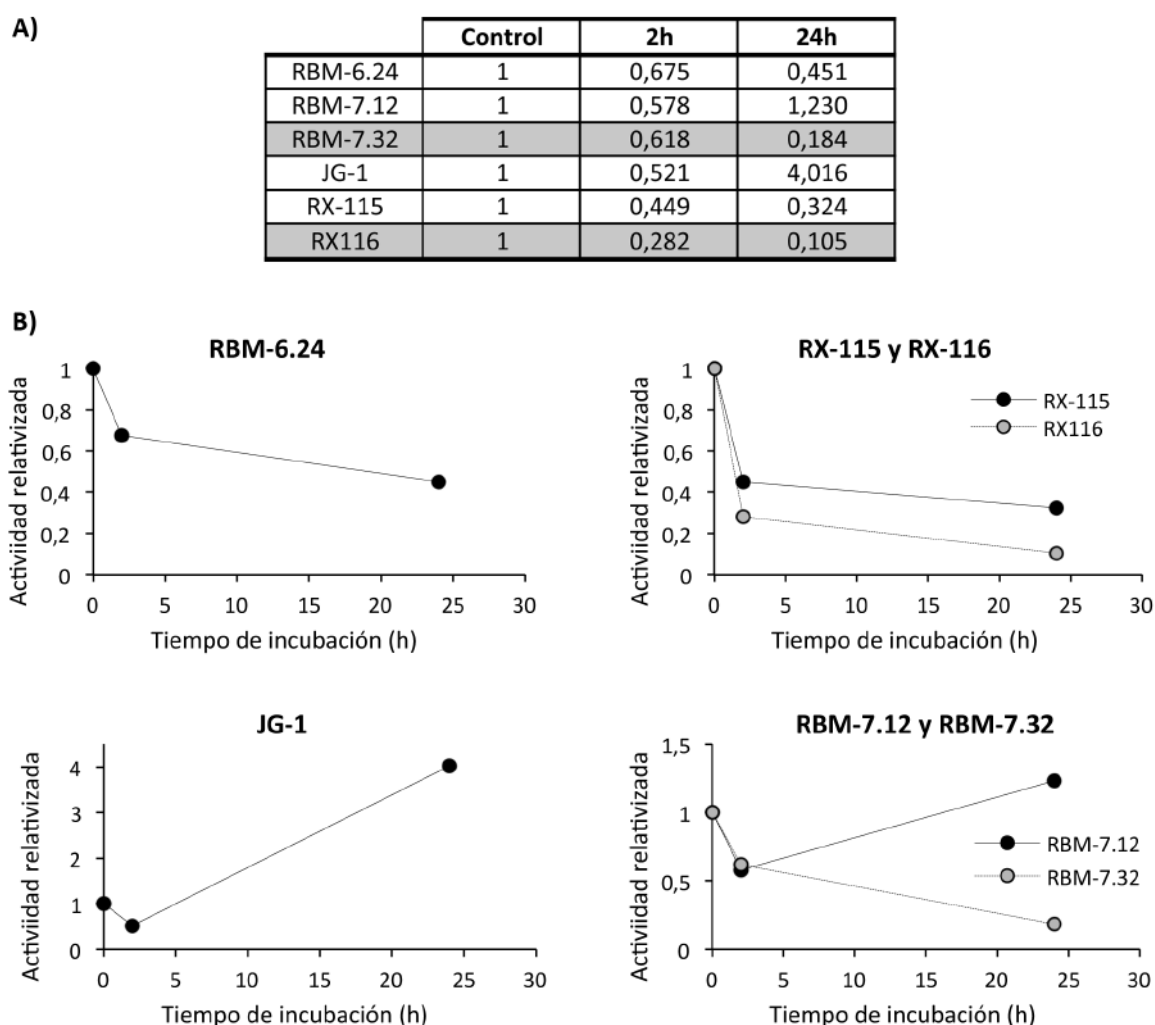


Figura R4.5. Efectividad de los inhibidores en cultivos de células N2a. A) La tabla muestra los datos de actividad de SPL, normalizados con respecto al correspondiente control (sin inhibidor), tras la incubación de los cultivos celulares durante 2 y 24 horas (h) en presencia de RBM-6.24 (50 μ M), RX-115 (25 μ M), RX-116 (25 μ M), JG-1 (50 μ M), RBM-7.12 (25 μ M) o RBM-7.32 (25 μ M). El sombreado en gris claro señala los inhibidores con mayor efectividad inhibitoria en los ensayos realizados anteriormente (IC₅₀). B) Las gráficas ilustran los datos recogidos en la tabla A).

Dado que esta tendencia se mantiene tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de fosfatasa, estos resultados sugieren que los inhibidores analizados pueden tener una estabilidad limitada en condiciones fisiológicas y son posiblemente degradados o inactivados por componentes celulares distintos a las fosfatasas.

A continuación, determinamos la efectividad de los inhibidores en cultivos celulares, evaluando la actividad enzimática de SPL tras adicionar el inhibidor o la cantidad equivalente del vehículo correspondiente (control) al medio de los cultivos celulares de N2a durante 2 o 24 horas. Para la obtención del extracto celular, eliminamos previamente el medio de cultivo con el fin de eliminar el inhibidor remanente que no hubiera penetrado en las células. Los datos obtenidos en el presente ensayo se recogen en el correspondiente material suplementario del presente apartado (Sup. Mat. 29; Pág. 319). Como se aprecia en la Figura R4.5, tanto los inhibidores RBM-7.12 y RBM-7.32 como RBM-6.24 y sus correspondientes racematos, RX-115 y RX-116, son capaces de inhibir la actividad de SPL en los cultivos celulares. Sorprendentemente, los resultados ponen de manifiesto que la inhibición es mayor tras 24 horas de incubación que tras 2 horas, a pesar de que la exposición a potenciales componentes capaces de degradarlos, incluyendo fosfatasas, es mayor en el caso de 24 horas. Contrariamente a lo observado para estos inhibidores, RBM-7.12 y JG-1 presentan unos valores de actividad enzimática notablemente superiores a los registrados en muestras sin inhibidor. Teniendo en cuenta la elevada toxicidad de estos inhibidores tras 24 horas de incubación, claramente reflejada en el estado de los cultivos celulares antes de la extracción, podemos considerar que estos valores responden a artefactos relacionados con la mortandad celular y descartar, claramente, que los compuestos RBM-7.12 o JG-1 puedan estar actuando como potenciadores de la actividad enzimática de SPL.

En resumen, los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que la efectividad de inhibición de los compuestos RBM-7.32 y RX-116 es superior a la del resto de compuestos, especialmente tras 24 horas de incubación en células intactas. Estos resultados y su reducida citotoxicidad en células N2a señalan que los inhibidores RBM-7.32 y RX-116 cumplen las condiciones más favorables para su aplicabilidad en modelos biológicos.

RX-116, A SU IC₅₀, NO ES CAPAZ DE REVERTIR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DEL ETOPÓSIDO EN CÉLULAS N2A

Para evaluar la modulación de la actividad enzimática de SPL como estrategia citoprotectora, analizamos si la inhibición parcial de la actividad de SPL disminuye el descenso de la viabilidad celular causada cuando células neurales (N2a) son tratadas con un estímulo pro-apoptótico. Previamente a realizar este estudio, llevamos a cabo la puesta a punto de diferentes estímulos apoptóticos con el fin de seleccionar el estímulo y las condiciones que induzcan una reducción de viabilidad celular consistente y significativa. Para estos análisis, evaluamos la viabilidad celular, mediante ensayos de MTT, en cultivos de N2a tratados con diferentes concentraciones de etopósido, estaurosporina o peróxido de hidrógeno, empleando un diseño experimental por bloques con cuatro experimentos independientes (bloques). Los resultados obtenidos se muestran en detalle en el correspondiente apartado de material suplementario (Sup. Mat. 30; Pág. 320) y de manera resumida en la Figura R4.6. El análisis estadístico de los datos mediante tests de Kruskal-Wallis mostró cambios significativos en la viabilidad celular dependiendo de la concentración de los estímulos apoptóticos en todos los casos (ETO: $\chi^2_{(5)} = 18,650$, $p=0,002$; STS: $\chi^2_{(7)} = 32,954$, $p=2,7 \cdot 10^{-5}$; H₂O₂: $\chi^2_{(4)} = 33,937$, $p=7,676 \cdot 10^{-7}$). Los resultados

obtenidos mediante el test post-hoc de Conover demuestran que las diferencias con respecto a la muestra control correspondiente resultan significativas a una concentración 10 μ M de etopósido ($p=0,046$) y continúan siéndolo a concentraciones crecientes (30 μ M, $p=0,024$; 100 μ M, $p=0,001$). Sorprendentemente, los análisis estadísticos revelan diferencias significativas entre los cultivos sin estimular y los estimulados con estaurosporina a una concentración de 30nM ($p=0,001$) pero, sin embargo, las diferencias respecto al control se pierden al aumentar la concentración de estaurosporina a 100nM ($p=0,077$). Aunque no tan notable, en el tratamiento con peróxido de hidrógeno

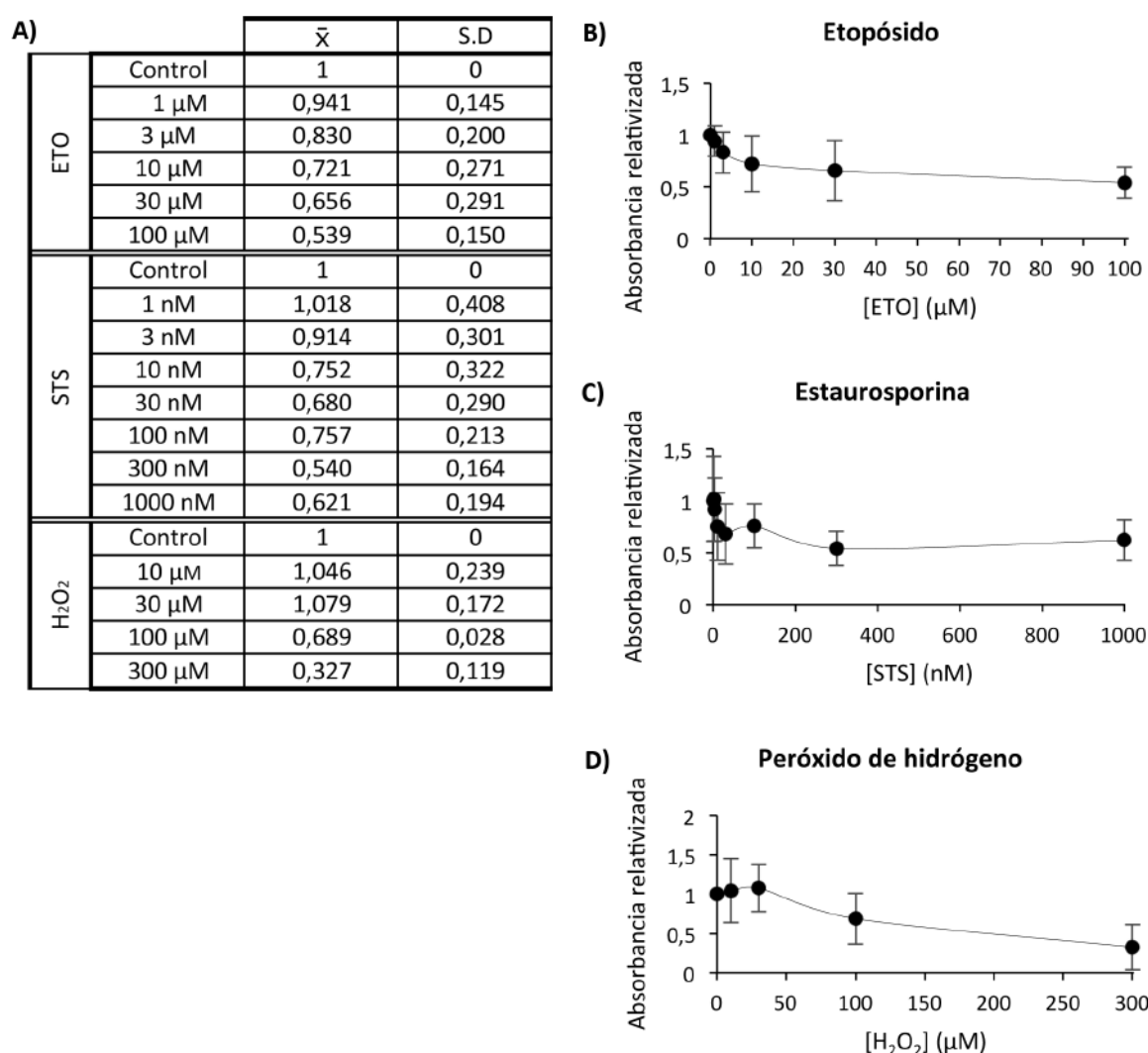


Figura R4.6. Determinación de los efectos de los distintos estímulos apoptóticos sobre la viabilidad celular en N2a. La tabla (A) muestra el promedio de los valores de viabilidad celular, medidos como absorbancia (UU.AA) en ensayos de MTT, en cultivos celulares de N2a estimulados con concentraciones crecientes de etopósido (ETO; 24h), estaurosporina (STS; 24h) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂; 3h), en cuatro experimentos independientes. Los valores de MTT de cada condición están normalizados con respecto a la muestra no estimulada tratada con el vehículo correspondiente (Control; DMSO para ETO y STS, y H₂OmQ para peróxido de hidrógeno). \bar{X} = promedio; S.D.= desviación estándar; blanco= muestra sin extracto celular.

A)	Sin Sph					
	Control		ETO		ETO + RX-116	
	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.
Sin Pre-trat.	0,874	0,097	0,437	0,092	0,500	0,140
4h Pre-trat.	0,739	0,127	0,436	0,104	0,466	0,162
20h Pre-trat.	0,708	0,110	0,383	0,074	0,410	0,045
	Con Sph (1μM)					
	Control		ETO		ETO + RX-116	
	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.
Sin Pre-trat.	0,769	0,238	0,433	0,052	0,456	0,121
4h Pre-trat.	0,685	0,198	0,383	0,068	0,465	0,155
20h Pre-trat.	0,620	0,134	0,378	0,079	0,400	0,043

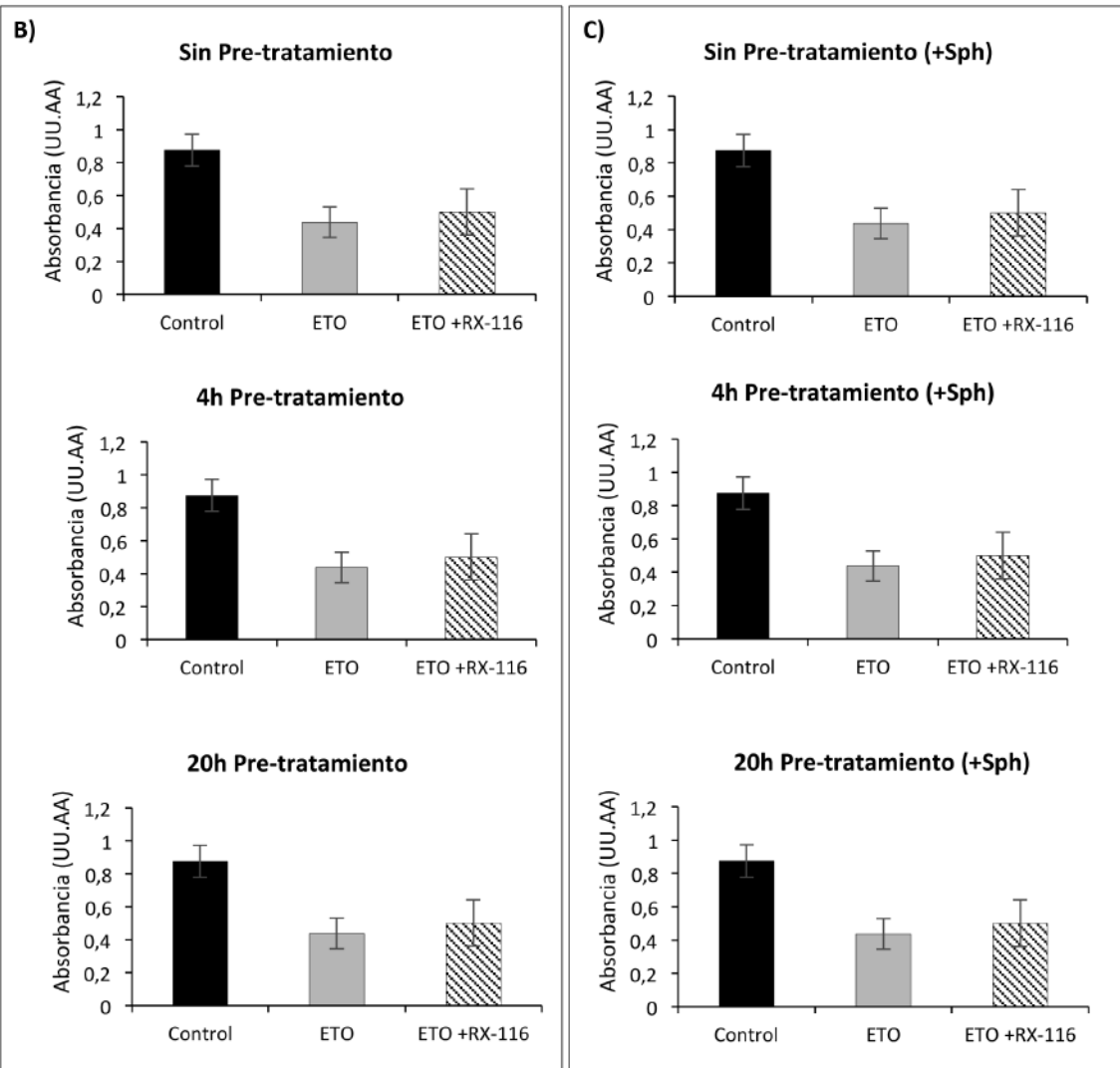


Figura R4.7. Efectos citoprotectores de RX-116 en células N2a (página opuesta). La tabla (A) muestra los valores de viabilidad celular (MTT, medidos en unidades arbitrarias de absorbancia) en cultivos celulares sin estimular (control) o estimulados con 20 μ M de etopósido (ETO) en presencia y ausencia del inhibidor RX-116 y de esfingosina (Sph, 1 μ M). Los cultivos se trataron con 6 μ M del inhibidor a diferentes tiempos: simultáneamente con el estímulo apoptótico (Sin Pre-trat.), 4 u 20 horas antes de la estimulación (4h Pre-trat. y 20h Pre-trat., respectivamente). Las gráficas ilustran los resultados obtenidos en los ensayos en ausencia (B) y presencia (C) de esfingosina exógena. \bar{X} = promedio; S.D.= desviación estándar; h= horas.

ocurre algo similar, presentando una menor significación a 10 μ M ($p=0,536$) que a 30 μ M ($p=0,904$) respecto a la muestra sin estimular. Así pues, considerando la consistente reducción de viabilidad celular alcanzada en el tratamiento con etopósido frente a la inconsistencia y elevada variabilidad observadas al estimular las células N2a con estaurosporina o peróxido de hidrógeno, decidimos seleccionar el etopósido como el estímulo más indicado para evaluar la potencial citoprotección inducida por la inhibición de la actividad enzimática de SPL. Del mismo modo, decidimos establecer una concentración de 20 μ M de etopósido para los ensayos de citoprotección ya que induce una disminución de la viabilidad celular (valores de MTT) cercana al 30%, suficiente para detectar los efectos protectores del tratamiento con el inhibidor de SPL.

Una vez establecidas las condiciones de estimulación del ensayo, evaluamos la capacidad citoprotectora del tratamiento con los inhibidores. A la vista de los resultados previos, decidimos seleccionar el inhibidor RX-116 para llevar a cabo estos ensayos debido a su escasa citotoxicidad y su elevada efectividad inhibitoria en células N2a ($IC_{50} = 6\mu M$). En estos ensayos, el tratamiento con el inhibidor se realizó de tres formas diferentes: una con tratamiento simultaneo a la estimulación apoptótica y otras dos con tratamientos previos a la estimulación (4 y 20 horas de pretratamiento). Teniendo en cuenta que estudios previos (Loetscher *et al.*, 2013) han señalado la necesidad de suplementar el medio celular con esfingosina para detectar un aumento de la concentración de S1P al inhibir la SPL, decidimos seguir la metodología propuesta por estos autores, incorporando análisis paralelos con cultivos tratados con esfingosina para evaluar si los efectos derivados de la inhibición de SPL podrían estar condicionados a la presencia de este factor. Los resultados obtenidos en estos ensayos se encuentran detallados en el material suplementario correspondiente (Sup. Mat. 31; Pág. 321) y resumidos en la Figura R4.7. El análisis estadístico de los datos empleando ANOVA de una vía y el test post-hoc de Tukey³¹ revela que, en todos los casos, la viabilidad celular se reduce significativamente al estimular las células N2a con etopósido ($p<0,002$). Por el contrario, aunque se puede observar una tendencia citoprotectora consistente (reflejada en un menor descenso de la viabilidad celular) al tratar las células estimuladas con el inhibidor RX-116, estas diferencias no resultan significativas en ningún caso ($p>0,05$), independientemente de que los ensayos hubiesen sido suplementados o no con esfingosina (ver Figura R4.7). Así pues, nuestros resultados demuestran que la deficiencia del 50% en la actividad enzimática de SPL inducida por el tratamiento con el inhibidor RX-116 no es suficiente para revertir los efectos apoptóticos del etopósido en células neurales N2a.

³¹Existe una única excepción que atañe a los datos obtenidos en el ensayo sin pre-tratamiento y en presencia de esfingosina. Dado que estos datos mostraban una heterocedasticidad significativa, empleamos el test de Kruskal-Wallis y el test post-hoc de Conover en lugar de los tests de ANOVA y Tukey.

OTROS RESULTADOS INTERESANTES EN CURSO ...

Administración *in vivo* de los inhibidores RX-116 y RBM-7.32: estudios preliminares

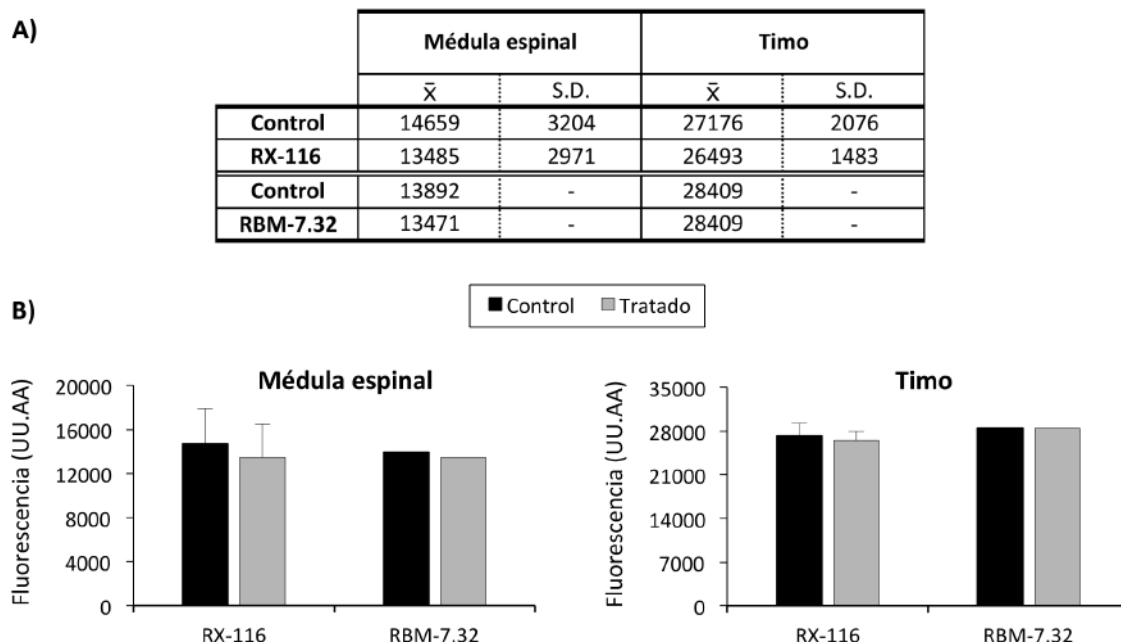


Figura R4.8. Actividad enzimática de SPL en ratones tratados con RX-116 y RBM-7.32. La tabla (A) muestra el promedio de los valores de actividad enzimática de SPL, medidas como fluorescencia (UU.AA), en médula espinal (B) y tímo (C) tras la administración intraperitoneal del inhibidor RX-116 (25mg/Kg), RBM-7.32 (50mg/Kg) o sus vehículos correspondientes (Control; DMSO y H₂O, respectivamente). $n=3$ individuos para los ensayos con RX-116 y DMSO y $n=1$ para RBM-7.32 y H₂O. Las muestras de médula espinal y tímo fueron extraídas 6 horas después del tratamiento. \bar{x} = promedio; S.D.= desviación estándar.

Tras comprobar *in vitro* la efectividad en la inhibición de la actividad enzimática de SPL de algunos de los compuestos analizados en el presente apartado, decidimos evaluar si su administración *in vivo* permite reducir la actividad de SPL. Para ello, realizamos una primera aproximación administrando por vía intraperitoneal los inhibidores RX-116 o RBM-7.32 a una concentración de 25mg/Kg o 50 mg/Kg, respectivamente y analizando, a 6 horas post-administración, la actividad enzimática de SPL en la médula espinal y el tímo. Los valores de actividad SPL en médula y tímo³² tras el tratamiento con los inhibidores o sus correspondientes vehículos se encuentran recogidos en detalle en el material suplementario del presente apartado (Sup. Mat. 32.; Pág. 321). Como se aprecia en la Figura R4.8, la actividad enzimática de SPL tras los tratamientos permanece prácticamente inalterada, tanto en la médula espinal como en el tímo. Aunque la actividad de SPL en la médula espinal de los animales tratados se muestra ligeramente inferior que en los animales tratados con sus correspondientes vehículos, estas diferencias resultan *a priori* irrelevantes sugiriendo que ni RX-116 ni RBM-7.32 permiten reducir eficazmente la actividad de SPL en médula espinal o tímo. La causa de la falta de efecto de los inhibidores en estos ensayos está por analizar, pero podría deberse a las condiciones

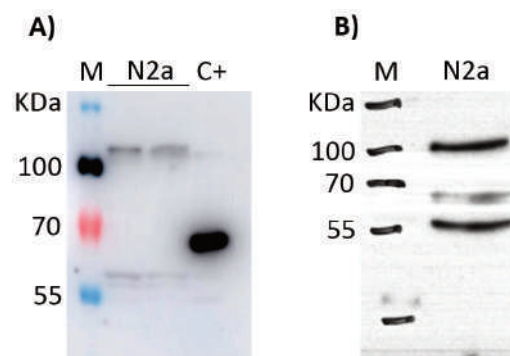
³²Aunque no es posible realizar una conversión directa de las concentraciones *in vitro* a *in vivo*, asumiendo que la densidad de los animales está próxima a 1g/cm³, es posible estimar el volumen de los animales y, con ello, determinar la concentración en unidades comparables a las empleadas en los ensayos *in vitro*. De acuerdo con esta premisa, los 25 y 50 mg/Kg administrados a los animales corresponden aproximadamente a 25 y 50 mg/L que, considerando la masa molecular de los inhibidores RX-116 y RBM-7.32 (365,45 g/mol y 711,82 g/mol, respectivamente), equivale a aproximadamente 70μM en ambos casos, netamente superiores a los IC₅₀ estimados para ambos inhibidores (~6μM para RX-116 y ~14μM para RBM-7.32).

empleadas en el análisis (vía de administración, tiempo de extracción...) y no necesariamente ser consecuencia de una falta de efectividad del inhibidor en los órganos analizados.

Expresión proteica de SPL en células N2a: ¿una isoforma truncada?

Durante los experimentos llevados a cabo en esta tesis, realizamos diversos análisis de la expresión de SPL en extractos procedentes de diversas fuentes, incluyendo células N2a. Sorprendentemente, todos los extractos de N2a presentan una banda a aproximadamente 55KDa que, al compararla con el control positivo (hígado de rata), claramente no corresponde a la banda de 63KDa descrita para SPL (Figura R4.9.A). Como se aprecia en la película fotográfica ilustrada en la gráfica (Figura R4.9.B), la banda correspondiente a 63 KDa también aparece en células N2a aunque su concentración es notablemente inferior a la de la banda de 55KDa. Adicionalmente, los WB realizados también presentan una nítida banda de alto peso molecular (101KDa), que aparece descrita en la hoja de datos del anticuerpo como banda inespecífica.

Figura R4.9. Bandas identificadas en el análisis de la expresión de SPL en células N2a. La figura muestra los resultados obtenidos mediante western blot en el análisis de expresión de la SPL de distintas muestras de extracto celular N2a. M= marcador; C+= control positivo (hígado de rata).



Contrariamente a esta banda inespecífica de 101KDa, la banda de 55KDa podría corresponder a una isoforma truncada de la SPL. Para evaluar esta posibilidad, decidimos realizar un análisis mediante MRM para detectar la presencia del péptido “AGYPLEKFDFR”, proteotípico para la enzima SPL, en las bandas presentes en los extractos de N2a. Para este ensayo, empleamos una muestra de extracto de proteína de células N2a extraída en tampón RIPA y sometida a un proceso de precipitación mediante CHCl_3 con el fin de reducir las impurezas de la muestra y con ello favorecer las condiciones para el análisis mediante MRM. Una parte del extracto fue empleada para realizar un WB donde localizar las bandas con marcaje de SPL (Figura R4.9.A) y resto fue separado también mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y empleado para extraer muestras de las pesos moleculares correspondientes a las diferentes bandas identificadas en el WB (101KDa, 63KDa y 55KDa). Previo al análisis mediante MRM, cada muestra fue suplementada con 1pmol del péptido AQUA™ de la secuencia “AGYPLEKFDFR” marcada isotópicamente. Los resultados obtenidos permitieron identificar claramente la presencia del péptido “AGYPLEKFDFR” endógeno en la banda de 55KDa (Figura R4.10.A), incluso a concentraciones superiores a las del péptido AQUA™. En la banda de 63KDa también parece estar presente el péptido, si bien su intensidad es mucho menor que la del péptido sintético y que la observada en la banda correspondiente a 55KDa (Figura R4.10.B). Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante western blot (Figura R4.9.B), donde la intensidad de la banda a 55KDa es claramente superior a la observada a 63KDa. Por último, los resultados de MRM de la

banda correspondiente a ~100KDa no revelan la presencia del péptido endógeno confirmando que, de acuerdo con lo descrito en la hoja de datos del anticuerpo, se trata de una banda inespecífica (Figura R.10.C).

Dada la posible existencia de una isoforma trunca de la SPL en las células N2a, decidimos comprobar su presencia o ausencia de esta banda en western blots realizados con extractos de proteína procedente de diferentes órganos de ratón (médula espinal, cerebro, timo y bazo). Como se aprecia en la Figura R4.11, a tiempos de exposición cortos (óptimos para la detección de la banda de SPL a 63KDa), no se aprecia la existencia de bandas adicionales, a excepción de la inespecífica descrita a 101KDa. Sin embargo, las películas más expuestas permiten apreciar la presencia recurrente de una banda de 55KDa, especialmente en muestras de cerebro, aunque frecuentemente también en muestras de médula espinal (Figura R4.11). Esta banda parece ausente en timo y bazo, aunque en algunos casos, se puede observar una banda adicional, claramente inferior a 55KDa. Todas estas evidencias parecen indicar la existencia de una isoforma trunca de SPL, al menos, en el sistema nervioso central, si bien estos resultados son preliminares y no pueden ser considerados concluyentes.

Figura R4.10. Presencia del péptido “AGYPLEKFDFR” en las bandas de extractos proteicos de N2a. La figura muestra la intensidad de las transiciones del péptido “AGYPLEKFDFR” sintético (AQUA™, heavy) y endógeno monitorizadas mediante MRM en muestras extraídas a ~55KDa (A), ~63KDa (B) y ~100KDa (C) en el gel de poliacrilamida. Se consideran detectables aquellas transiciones con una intensidad mayor de 200 unidades.

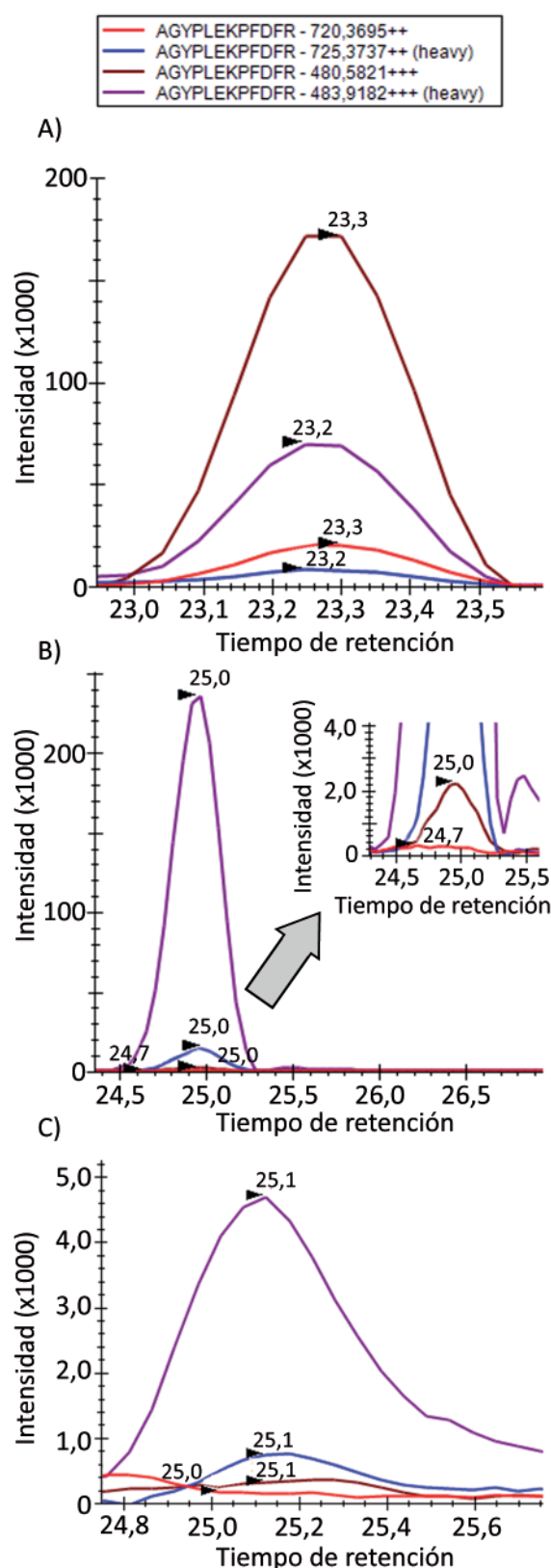
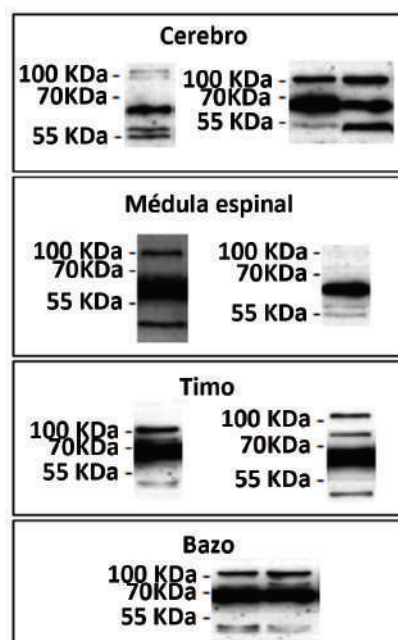


Figura R4.11. Bandas identificadas en la expresión de SPL en órganos de ratón. La figura ilustra las bandas identificadas por el anticuerpo contra la SPL en muestras de cerebro, médula espinal, timo y bazo procedentes de ratones.



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en apartados precedentes de la presente tesis sugieren que la modulación de SPL es una potencial estrategia terapéutica en el tratamiento de la lesión medular. Así pues, considerando que la SPL degrada de manera irreversible al metabolito pleiotrópico S1P, la hipótesis planteada defiende que la inhibición de la actividad enzimática de SPL induce un incremento de la concentración de S1P con potenciales efectos beneficiosos sobre los daños inducidos por la lesión medular. La falta de coherencia entre los niveles de expresión génica, proteica y actividad enzimática de SPL dificulta la evaluación de los efectos de la inhibición de SPL mediante aproximaciones genéticas, tal y como pudimos observar en los estudios descritos anteriormente, empleando ratones transgénicos deficientes en *Sgpl1*. Por ello, en estos estudios planteamos inhibir directamente la actividad enzimática de SPL empleando fármacos, una aproximación que posibilitaría evaluar de manera más directa los efectos de la modulación de esta enzima. Sin embargo, la mayoría de los compuestos disponibles comercialmente descritos como inhibidores de la SPL (tales como el THI, el LX2931 -análogo al THI-, el GT11 -inhibidor específico de la enzima dihidroceramida desaturasa a bajas concentraciones pero que, a elevadas concentraciones, inhibe la actividad de la SPL (Triola *et al.*, 2004)-, el DOP -antagonista de la vitamina B6- o el V2S1P y el FTY720 -análogos estructurales de la S1P-) presentan severos inconvenientes para su aplicación tales

como escasa eficacia, alta citotoxicidad o inespecificidad. Esta falta de inhibidores de SPL apropiados es uno de los mayores inconvenientes para evaluar la modulación de esta enzima como estrategia terapéutica. Estas carencias ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos fármacos y evaluar su efectividad en la inhibición de la SPL y sus efectos nocivos (citotoxicidad) al ser empleados en muestras biológicas.

Nuestros resultados han permitido establecer la efectividad inhibitoria de los compuestos sintetizados por el equipo de investigadores del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC) mediante la determinación de su concentración media inhibitoria en células neurales (N2a) señalando como inhibidores más efectivos los compuestos RX-116, RBM-7-12 y RBM-7.32. El compuesto RX-116 es claramente el inhibidor más efectivo en función de su concentración media inhibitoria ($IC_{50}=6\mu M$) requiriendo prácticamente la mitad de la concentración necesaria en el caso de los otros dos inhibidores (RBM-7.12: $IC_{50}\approx 12\mu M$, RBM-7.32: $IC_{50}\approx 14\mu M$). Es importante mencionar que la IC_{50} calculada en este estudio se refiere a la cantidad de compuesto necesaria para reducir la actividad enzimática de SPL en un 50% (IC_{50} absoluto *sensu* Sebaugh, 2011). Sin embargo, este valor sólo es orientativo y depende estrechamente de las condiciones empleadas para su determinación, incluyendo la muestra celular empleada o la metodología empleada (Sebaugh, 2011). En el caso del RX-116, un análogo estructural de la S1P, la adición del sustrato fluorogénico necesario para llevar a cabo el ensayo de actividad enzimática supone un aumento de la concentración de especies que compiten por el centro activo de la SPL por lo que, en ausencia del sustrato fluorogénico, la efectividad del inhibidor podría ser mayor, disminuyendo su IC_{50} . Del mismo modo, resulta curiosa la alta eficacia de los inhibidores RBM-7.12 y RBM-7.32 considerando su naturaleza similar al compuesto resultante de la unión de la S1P y el PLP y que, por tanto, podrían estar compitiendo tanto con el sustrato fluorogénico como con el cofactor PLP suplementados en el ensayo enzimático lo que sugiere su efectividad real en las células N2a podría ser, al igual que en el caso de RX-116, superior a la determinada en estos estudio.

Además de su efectividad, los estudios llevados a cabo en este apartado han permitido determinar la citotoxicidad de estos compuestos, un aspecto fundamental para su uso en sistemas biológicos. Así en lo que se refiere a RX-116, aunque muestra efectos citotóxicos a altas concentraciones, su reducida concentración inhibitoria ($IC_{50}<10\mu M$) y su inocuidad a bajas concentraciones parecen indicar que su empleo en condiciones adecuadas es posible en sistemas biológicos. Este compuesto tiene la ventaja adicional de que es el que experimenta menor degradación o pérdida de actividad con el tiempo, aunque, en su contra, requiere el uso de disolventes orgánicos como el DMSO para su administración, lo cual puede condicionar su aplicación terapéutica dada la toxicidad de estos compuestos (Galvao *et al.*, 2014). En el caso de RBM-7.32, los resultados obtenidos permiten postular este compuesto como un candidato ideal para la inhibición en muestras biológicas ya que, además de ser altamente eficaz, no induce efectos citotóxicos ni a elevadas concentraciones ni dependientes del tiempo de tratamiento. Los ensayos evaluando la efectividad de este compuesto en presencia de inhibidores de fosfatasa revelan que su acción disminuye durante las primeras 72 horas de incubación, sugiriendo que RBM-7.32 se degrada progresivamente. Los posibles subproductos derivados de la degradación de este compuesto tampoco resultan nocivos (en base a la ausencia de citotoxicidad mencionada anteriormente) aportando la ventaja adicional de que el tratamiento con este inhibidor puede ser empleado de manera temporal y ser eliminado de manera natural días des-

pués de su administración, aunque, en contraposición, para mantener la inhibición de SPL durante tiempos prolongados este tratamiento requeriría un mayor número de dosis. Otra de las ventajas que plantea RBM-7.32 es su capacidad para disolverse en agua lo cual elimina la necesidad de emplear disolventes orgánicos como el DMSO (disolvente del inhibidor RX-116) favoreciendo la seguridad del tratamiento con RBM-7.32 en modelos biológicos. Por el contrario, los resultados obtenidos para el inhibidor RBM-7.12 ponen de manifiesto una marcada reducción de la viabilidad celular en las células tratadas con este compuesto señalando que, a pesar de su elevada eficacia inhibitoria, su aplicación en organismos no parece recomendable. Al evaluar la estabilidad de este compuesto en presencia de inhibidores de fosfatasa comprobamos que, al igual que RBM-7.32, podría ser degradado en los primeros días tras su administración. Aunque se desconocen los mecanismos por los que RBM-7.12 induce efectos nocivos en células N2a, nuestros resultados señalan que, además de la posible acción del propio compuesto, estos efectos citotóxicos podrían deberse a los subproductos generados en su degradación, ya que la mayor reducción de viabilidad celular se observa a 48 y 72 horas, tiempo en el que observa menor capacidad inhibitoria sugiriendo una mayor degradación que la observada a 24 horas.

Tras realizar la caracterización de los inhibidores de SPL, decidimos realizar una primera aproximación para evaluar la modulación de la SPL como estrategia citoprotectora en células neurales. Para ello, empleamos una concentración de etopósido capaz de inducir una reducción de la viabilidad celular del 25-30% y el inhibidor RX-116 a su concentración IC_{50} con el objetivo de reducir a la mitad la actividad enzimática de SPL. Seleccionamos este compuesto por su baja IC_{50} y porque, al igual que RBM-7.32, es capaz de inhibir la actividad SPL en células vivas, según nuestros ensayos de permeabilidad. Estos ensayos también pusieron de manifiesto un notable incremento de la actividad inhibitoria del compuesto RX-116 al aumentar el tiempo de incubación de las células hasta las 24 horas. Teniendo en cuenta estos resultados, tomamos la decisión de evaluar la respuesta de las células cuando se enfrentan al estímulo apoptótico con bajos niveles de actividad SPL aplicando pre-tratamientos de 20 y 4 horas o tratándolas simultáneamente con estímulo e inhibidor. Los resultados obtenidos muestran que, en todos los casos, se mantiene una tendencia no significativa a una menor reducción de la viabilidad celular en presencia de $6\mu M$ de RX-116, sugiriendo la capacidad citoprotectora de la inhibición de SPL. Ante estos resultados, una de las cuestiones que pueden plantearse es si la reducción de actividad de SPL inducida por la concentración de inhibidor (reducción del 50%) podría ser la causa subyacente a la ausencia de diferencias significativas en la viabilidad celular. Estudios previos realizados en cultivos primarios de neuronas, han demostrado diferencias en la concentración de S1P en ratones con una inhibición completa de SPL (SPL^{-/-}) mientras que, en ratones con deficiencia parcial de SPL muestran niveles de S1P similares a los ratones silvestres (Hagen *et al.*, 2009). A pesar de las diferencias que puedan existir entre la inhibición génica y la inhibición farmacológica de SPL, la ausencia de cambios en la concentración de S1P en la inhibición parcial de SPL plantea la posibilidad de que la reducción de actividad enzimática inducida no sea suficiente para revertir los efectos del estímulo apoptótico. Considerando estos resultados, resultaría interesante realizar ensayos de citoprotección adicionales aumentando la concentración de inhibidor y evaluar si la magnitud de inhibición enzimática inducida condiciona la capacidad citoprotectora de SPL. Otra posible razón de la falta de cambios significativos es el empleo de etopósido como estímulo apoptótico en los ensayos, ya que se trata de un estímulo genotóxico, es decir, afectando directamente al ADN. El etopósido actúa como in-

hibidor de la topoisomerasa II, arrestando el ciclo celular (Nam *et al.*, 2010) y, además, activa la vía de señalización de p53 e induce la vía intrínseca de apoptosis y el estrés del retículo endoplasmático (Giorgi *et al.*, 2015; Hande, 1998; Karpinich *et al.*, 2002). Brevemente, p53 induce la activación de moléculas pro-apoptóticas como Noxa y PUMA que permeabilizan la membrana mitocondrial, liberando citocromo c y activando las caspasas efectoras que inducen la muerte celular. En este sentido, es interesante señalar que la S1P ha demostrado previamente su capacidad para revertir la traslocación del citocromo c desde la mitocondria al citosol, inhibiendo así el proceso de apoptosis y la consecuente muerte celular (Cuvillier *et al.*, 1996; Cuvillier & Levade, 2001). Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, el etopósido también induce la muerte celular por otras vías, como el arresto del ciclo celular y el estrés del retículo endoplasmático, por lo que no resultaría descabellado hipotetizar que la modulación de SPL permita revertir únicamente una parte de los efectos citotóxicos inducidos por el etopósido y que, por tanto, su efecto en la supervivencia celular no resulte estadísticamente significativo. Esta posibilidad también pone de manifiesto el interés de continuar evaluando el efecto citoprotector de la modulación de S1P ante diferentes estímulos inductores de muerte celular a través de distintas vías de señalización. En el presente apartado, además del etopósido, evaluamos varios estímulos apoptóticos adicionales como la estaurosporina o el peróxido de hidrógeno en base a los mecanismos por los que inducen la muerte celular. La estaurosporina podría permitir evaluar la citoprotección mediada por la inhibición de SPL debido a que actúa alterando las vías de señalización de Erk y Akt (Antonsson & Persson, 2009), vías en las que participa S1P a través de la señalización mediada por sus receptores (Brinkmann, 2007; Takabe *et al.*, 2008). Sin embargo, la estaurosporina también actúa como inhibidor de quinasas (v.g.: PKC, CDK1/ciclina B, CDK2/cyclin A, etc.) y, al igual que el etopósido, como inhibidor de la topoisomerasa II (Lassota *et al.*, 1996), por lo que la complejidad de actuación de este estímulo también podría suponer un inconveniente a la hora de establecer la potencialidad citoprotectora de la modulación de SPL. Por su parte, el peróxido de hidrógeno induce estrés oxidativo debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen la vía intrínseca de la apoptosis a través de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c. Considerando la capacidad de S1P, comentada anteriormente, para modular esta vía y que la generación de ROS es uno de los procesos que tiene lugar en la muerte secundaria tras la lesión medular (Profyris *et al.*, 2004), el empleo de este estímulo permitiría una aproximación, aunque limitada, a los efectos de la modulación de SPL tras la lesión medular. Lamentablemente, nuestros resultados mostraron una elevada variabilidad en la reducción de viabilidad celular inducida por este estímulo, limitando su utilización en los ensayos de citoprotección realizados. No podemos descartar que esta variabilidad sea debida a la metodología empleada para evaluar la viabilidad celular (MTT), por lo que resultaría interesante refinar estos estudios y evaluar el papel de la modulación de SPL sobre la muerte celular inducida tanto por peróxido de hidrógeno como por otros estímulos apoptóticos involucrados más directamente en las vías de señalización activadas por S1P (v.g.: apoptosis mediada por ceramidas).

En cuanto a los ensayos preliminares llevados a cabo en este apartado administrando RX-116 y RBM-7.32 intraperitonealmente en ratones, los resultados obtenidos muestran una ausencia de efectos significativos sobre la actividad de SPL en médula espinal y timo aunque se aprecia un ligero descenso en los animales tratados. Esta falta de efectos parece sugerir que los inhibidores evaluados son ineficaces *in vivo*. Sin embargo, el carácter preliminar de estos análisis no permite alcanzar conclusiones

definitivas ya que la falta de efectos también podría ser debida al diseño experimental empleado en estos ensayos. Principalmente, la ausencia de un estudio LADME (liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción) detallado no posibilita establecer los parámetros de administración que optimicen la llegada de los inhibidores a los órganos diana. Concretamente, es posible que la vía de administración empleada (inyección intraperitoneal) no sea la más adecuada para este tipo de fármacos, limitando la distribución de cantidades suficientes del fármaco en los órganos analizados. Este aspecto es particularmente relevante en el caso del sistema nervioso central dadas las limitaciones en el tránsito de compuestos que impone la barrera hematoencefálica (Domínguez *et al.*, 2013). Sería pues necesario evaluar otras vías de administración, incluyendo la administración local, para establecer de forma concluyente la eficacia de estos inhibidores. Asimismo, la concentración empleada ($\sim 70\mu\text{M}$ en ambos casos) también podría ser insuficiente para poder inducir un efecto significativo, más aun si consideramos la pérdida de actividad de los compuestos a lo largo del tiempo observada en los cultivos celulares incluso cuando se inhibe la actividad de las fosfatasa. En este sentido, determinar la IC_{50} de estos inhibidores en muestras *ex vivo* de médula espinal y de timo podría aportar información relevante sobre la concentración de inhibidor necesaria para causar efecto en estos tejidos. En conjunto, la elevada cantidad de factores que pueden condicionar la ausencia de efectos pone de manifiesto la necesidad de optimizar las condiciones de administración *in vivo*, evaluando la vía de administración más adecuada y realizando los estudios farmacocinéticos necesarios para determinar la distribución, efectividad y tiempo de vida medio de RX-116 y RBM-7.32 en los diferentes órganos y, particularmente, en la médula espinal.

Por último, es interesante mencionar que durante los análisis de la expresión de SPL mediante WB realizados en muestras tanto de células N2a como de diferentes tejidos de ratón hemos observado una banda diferente a la corresponde a los 63 KDa descritos para esta enzima. Esto resultados sugieren la existencia de isoformas de SPL (isoenzimas) en *Mus musculus*. En el caso de la isoforma o isoenzima de movilidad aproximada a 55KDa que aparece en los extractos de células de neuroblastoma N2a, la posibilidad de que corresponda a una isoforma fue confirmada por la identificación del péptido "AGYPLEKFDFR", proteotípico de SPL, en estos niveles de movilidad. Según recogen diferentes bases de datos (v.g.: NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/), se han propuesto algunas variantes de esta enzima, incluyendo varias isoformas en ratón. Sin embargo, las únicas variantes validadas corresponden a diferencias localizadas en la región 5'-UTR de los transcritos que no afectan al tamaño ni a la secuencia de la proteína resultante (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20397). Por tanto, nuestros resultados podrían suponer la primera demostración de la expresión de una isoforma alternativa de SPL en células de ratón. Además, considerando que la expresión de SPL (55KDa) es mayoritaria en comparación con la expresión de SPL (63KDa) y que nuestros resultados han demostrado una notable actividad de SPL en células neurales (N2a), estas evidencias sugirieron que la isoforma de 55KDa presenta actividad enzimática y que, por tanto, se trataría de una isoforma activa. Interesantemente, en nuestros análisis esta isoforma aparece únicamente en células neurales (línea celular Neuro2a, cerebro y médula) y está ausente en las muestras de timo y bazo analizadas, aunque se aprecia cierta inmunoreactividad contra SPL a niveles correspondientes a un peso claramente inferior a 55KDa. Esto podría indicar que la isoforma truncada de 55KDa identificada es específica del sistema nervioso. Este amplio abanico de posibilidades pone de manifiesto el interés de seguir investigando sobre la expresión de posibles isoformas de SPL, así como su especificidad y participación en el metabolismo de los

esfingolípidos, pudiendo dar lugar a nuevas aproximaciones a considerar en el estudio de la inhibición de SPL, especialmente en el sistema nervioso central.

En conjunto, los análisis realizados en este apartado han permitido validar la utilidad de varios compuestos de nueva génesis para la inhibición de la actividad SPL *in vitro*. Sin embargo, será necesario desarrollar nuevos análisis en detalle para completar los objetivos planteados y evaluar tanto el efecto citoprotector de los tratamientos con estos inhibidores como su potencial terapéutico en el ámbito de la lesión medular, particularmente teniendo en cuenta que el SNC podría expresar una isoforma específica de la enzima SPL.

CONCLUSIONES

La caracterización de los cambios de concentración de los esfingolípidos tras la lesión medular nos han permitido establecer que:

1. Médula espinal, sangre y suero presentan perfiles esfingolipídicos característicos, que se mantienen prácticamente inalterados tras la LME. Los cambios de concentración que se producen en la médula espinal afectan únicamente a un conjunto muy definido de especies, principalmente la S1P, las bases esfingoides (Sph y dhSph) y varias especies N-aciladas C16. Según las evidencias obtenidas, los cambios en la médula espinal parecen ser independientes de la entrada de componentes sanguíneos a la médula espinal.
2. La S1P aumenta su concentración tras la LME de manera paralela a la concentración de Sph, excepto a 3 y 21dpo. Interesantemente, la Sph también mantiene una relación muy estrecha con la dhSph, relacionando de forma indirecta dhSph y S1P, es decir, la síntesis de esfingolípidos y su degradación.
3. Las concentraciones de las diferentes especies N-acilada C16 con cambios tras la LME están estrechamente relacionadas, independientemente de su conexión a través de la ruta metabólica.
4. La LME induce cambios en la concentración de diversas especies de esfingolípidos en sangre y suero que, en algunos casos como GluCer22:1 o la Glucer18:0, podrían ser útiles como biomarcadores de LME.

Los posteriores análisis de las enzimas responsables del metabolismo de S1P mostraron que:

1. La LME induce cambios en la expresión de la enzima SPL y posiblemente en otras enzimas del metabolismo de S1P. La expresión de SPL aumenta a tiempos tempranos tras la lesión medular, cuando se observa un ligero descenso de la concentración de S1P, señalando la inhibición de SPL como una potencial herramienta terapéutica para modular la concentración de S1P.
2. Los cambios en expresión de proteína no coinciden con los cambios de expresión génica ni con los de actividad enzimática, ni entre estas últimas. Este hecho resulta relevante a la hora de diseñar herramientas terapéuticas basadas en la modulación de esta enzima.
3. La actividad enzimática de SPL presenta un perfil similar al de la concentración de S1P, lo que podría sugerir una regulación de la actividad enzimática de SPL mediada por su sustrato, S1P.

La evaluación de los efectos de la deficiencia de Sgpl1 en un modelo murino de lesión medular por contusión ha permitido demostrar que:

1. La deficiencia en la expresión de Sgpl1 podría favorecer la recuperación funcional tras la LME en ratones pero nuestros resultados no son concluyentes.
2. La deficiencia parcial del gen Sgpl1 no altera los cambios de expresión génica, proteica ni de actividad enzimática en la médula espinal inducidos tras la LME. Asimismo, tampoco induce un aumento de la concentración de S1P, que sigue mostrando una estrecha relación con la concentración de Sph, si bien esta relación es distinta a la observada en los ratones silvestres.

3. La incoherencia entre la ausencia de cambios moleculares y las posibles mejoras funcionales observadas sugiere que éstas podrían deberse a cambios ajenos a la médula espinal, probablemente en el sistema inmune. Sin embargo, no podemos descartar que estas incongruencias sean debidas a alteraciones no controladas en los animales transgénicos.

Los ensayos realizados con inhibidores farmacológicos de la SPL demostraron que:

4. Los compuestos RBM-7.32 y RX-116 son efectivos en la inhibición de la actividad enzimática de SPL sin comprometer gravemente la viabilidad de cultivos celulares del neuroblastoma murino Neuro2a. Sin embargo, la inhibición farmacológica de la actividad SPL no muestra efectos citoprotectores significativos en estas células, aunque sería necesario extender los análisis a otras condiciones para confirmar esta conclusión.
5. Interesantemente, los estudios realizados sugieren que la SPL podría tener una isoforma truncada, presente en células Neuro2a y en el sistema nervioso central.

BIBLIOGRAFÍA

- Acker, M.G. & Auld, D.S., 2014. Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspectives in Science*, 1(1–6), pp.56–73.
- Aebersold, R., Burlingame, A.L. & Bradshaw, R. a, 2013. Western Blots vs. SRM Assays: Time to turn the tables? *Molecular & cellular proteomics*, pp.2381–2382.
- Aflaki, E. et al., 2012. C16 ceramide is crucial for triacylglycerol-induced apoptosis in macrophages. *Cell Death and Disease*, 3(3), p.e280.
- Allende, M.L. et al., 2011. Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), pp.7348–7358.
- Altman, F.P., 1974. Studies on the Reduction of Tetrazolium Salts III. The Products of Chemical and Enzymic Reduction. *Histochemistry*, 38, pp.155–171.
- Ancellin, N. et al., 2002. Extracellular Export of Sphingosine Kinase-1 Enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 277(8), pp.6667–6675.
- Anderson, M.A. et al., 2016. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*, 532(1), pp.195–200.
- Antonsson, A. & Persson, J.L., 2009. Induction of apoptosis by staurosporine involves the inhibition of expression of the major cell cycle proteins at the G2/M checkpoint accompanied by alterations in Erk and Akt kinase activities. *Anticancer Research*, 29(8), pp.2893–2898.
- Bagdanoff, J.T. et al., 2009. Inhibition of sphingosine-1-phosphate lyase for the treatment of autoimmune disorders. *Journal of medicinal chemistry*, 52(13), pp.3941–53.
- Bagdanoff, J.T. et al., 2010. Inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase for the treatment of rheumatoid arthritis: discovery of (E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-1H-imidazol-2-yl)ethanone oxime (LX2931) and (1R,2S,3R)-1-(2-(isoxazol-3-yl)-1H-imidazol-4-yl)butane-1,2,3,. *Journal of medicinal chemistry*, 53(24), pp.8650–62.
- Bandhuvula, P. et al., 2005. The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *The Journal of biological chemistry*, 280(40), pp.33697–700.
- Bandhuvula, P. et al., 2011. S1P lyase: a novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury of the heart. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, (8), pp.22–25.
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), pp.215–233.
- Basso, D.M. et al., 2006. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal of neurotrauma*, 23(5), pp.635–59.
- Baumann, N. & Pham-Dinh, D., 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*, 81(2), pp.871–927.
- Beattie, M.S. et al., 2002. Cell death in models of spinal cord injury. *Progress in brain research*, 137, pp.37–47.
- Beattie, M.S., 2000. Review of Current Evidence for Apoptosis After Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma*, 17(10), pp.915–925.
- Beck, K.D. et al., 2010. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain: a journal of neurology*, 133(Pt 2), pp.433–47.
- Bedia, C. et al., 2009. Synthesis of a fluorogenic analogue of sphingosine-1-phosphate and its use to determine sphingosine-1-phosphate lyase activity. *ChemBioChem*, 10(5), pp.820–822.

- Bektas, M. et al., 2010. Sphingosine 1-Phosphate Lyase Deficiency Disrupts Lipid Homeostasis in Liver. *Journal of biological chemistry*, 285(14), pp.10880–10889.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B*, 57(1), pp.289–300.
- Berridge, M. V & Tan, A.S., 1993. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphrnyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(2), pp.474–482.
- Biase, A. De et al., 2005. Gene expression profiling of experimental traumatic spinal cord injury as a function of distance from impact site and injury severity. *Physiological genomics*, pp.368–381.
- Billich, A. et al., 2013. Partial deficiency of sphingosine-1-phosphate lyase confers protection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PloS one*, 8(3), p.e59630.
- Blázquez, C., Galve-roperh, I. & Guzmán, M., 2000. De novo -synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *The FASEB journal*, 14, pp.2315–2322.
- Bonin, R.P., Bories, C. & Koninck, Y. De, 2014. A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. *Molecular pain*, 10(1), pp.1–10.
- Borowsky, A.D. et al., 2012. Sphingosine-1-phosphate lyase expression in embryonic and adult murine tissues. *Journal of lipid research*, 53(9), pp.1920–31.
- Boumendjel, A. & Miller, S.P.F., 1994. Synthesis of an inhibitor of sphingosine-1-phosphate lyase. *Tetrahedron Letters*, 35(6), pp.819–822.
- Bourquin, F. et al., 2010. Structure and function of sphingosine-1-phosphate lyase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Structure* (London, England: 1993), 18(8), pp.1054–65.
- Bourquin, F., Capitani, G. & Grütter, M.G., 2011. PLP-dependent enzymes as entry and exit gates of sphingolipid metabolism. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 20(9), pp.1492–508.
- Bovolenta, P., Wandosell, F. & Nieto-Sampedro, M., 1992. CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Progress in brain research*, 94, pp.367–379.
- Bracken et al, M.B., 1990. A Randomized, Controlled Trial of Methylprednisolone or Naloxone in the Treatment of Acute Spinal-Cord Injury — Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *The New England Journal of medicine*, 322(20), pp.1405–1411.
- Brien, J.S.O. & Rouser, G., 1960. The fatty acid composition. *Journal of Lipid Research*, pp.339–342.
- Brinkmann, V., 2007. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics*, 115(1), pp.84–105.
- Brizuela, L. et al., 2012. First Evidence of Sphingosine 1-Phosphate Lyase Protein Expression and Activity Downregulation in Human Neoplasm: Implication for Resistance to Therapeutics in Prostate Cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 11(9), pp.1841–1851.
- Brugg, B., 1996. Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *Journal of Neurochemistry*, 66, pp.733–739.
- Buccoliero, R., Bodennec, J. & Futerman, A.H., 2002. The role of sphingolipids in neuronal development: lessons from models of sphingolipid storage diseases. *Neurochemical research*, 27(7–8), pp.565–74.

- Cannon, R.E. et al., 2012. Targeting blood-brain barrier sphingolipid signaling reduces basal P-glycoprotein activity and improves drug delivery to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), pp.15930–15935.
- Ceccom, J. et al., 2014. Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 2, p.12.
- Chacón, S.C. & Nieto-sampedro, M., 2005. Pathophysiology of spinal cord injury. A review. *Vet. Méx.*, 36(1), pp.75–86.
- Chalfant, C.E. & Spiegel, S., 2005. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *Journal of cell science*, 118(Pt 20), pp.4605–12.
- Chaplan, S.R. et al., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods*, 53, pp.55–63.
- Chi, X.X. & Nicol, G.D., 2010. The Sphingosine 1-Phosphate Receptor, S1PR1, Plays a Prominent But Not Exclusive Role in Enhancing the Excitability of Sensory Neurons. *Journal of neurophysiology*, (1988), pp.2741–2748.
- Chiba, K. et al., 2006. Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cellular & molecular immunology*, 3(1), pp.11–9.
- Chung, L.M. et al., 2014. Data Pre-Processing for Label-Free Multiple Reaction Monitoring (MRM) Experiments, pp.383–402.
- Coburn, S.P. et al., 1981. Effects of vitamin B6 deficiency and 4'- deoxypyridoxine on pyridoxal phosphate concentrations, pyridoxine kinase and other aspects of metabolism in the rat. *The Journal of nutrition*, 111(2), pp.391–398.
- Colangelo, C.M. et al., 2013. Review of software tools for design and analysis of large scale MRM proteomic datasets. *Methods* (San Diego, Calif.), 61(3), pp.287–98.
- Colié, S. et al., 2009. Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer research*, 69(24), pp.9346–53.
- Coste, O. et al., 2008. Sphingosine 1-phosphate modulates spinal nociceptive processing. *The Journal of biological chemistry*, 283(47), pp.32442–51.
- Courtine, G. et al., 2007. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? *Nature Methods*, 13(5), pp.561–566.
- Couttas, T. a et al., 2014. Loss of the neuroprotective factor Sphingosine 1-phosphate early in Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta neuropathologica communications*, 2(1), p.9.
- Cowart, L.A., 2008. Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease. *Cell Press*. (November). doi:10.1016/j.tem.2008.09.004.
- Cutler, R.G. et al., 2002. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress - Induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 52(4), pp.448–457.
- Cuvillier, O. & Levade, T., 2001. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac / DIABLO from mitochondria. *Blood*, 98(9), pp.2828–2836.
- Cuvillier, O. et al., 1996. Suppression of Ceramide-Mediated Programmed Cell Death by Sphingosine-1-Phosphate. *Nature*, 381, pp.800–803.

- Cuvillier, O., 1998. Sphingosine 1-Phosphate Inhibits Activation of Caspases that Cleave Poly(ADP-ribose) Polymerase and Lamins during Fas- and Ceramide-mediated Apoptosis in Jurkat T Lymphocytes. *Journal of biological chemistry*, 273(5), pp.2910–2916.
- Cuzzocrea, S. et al., 2009. Inhibition of Ceramide Biosynthesis Ameliorates Pathological Consequences of Spinal Cord Injury. *Shock*, 31(6), pp.635–645.
- D**as, A. et al., 2013. The promotion of mandibular defect healing by the targeting of S1P receptors and the recruitment of alternatively activated macrophages. *Biomaterials*, 34(38), pp.9853–9862.
- David, S. & Ousman, S.S., 2002. Recruiting the Immune Response to Promote Axon Regeneration in the Injured Spinal Cord. *The neuroscientist*. pp. 33–41.
- De Graaf, E.L. et al., 2011. Improving SRM assay development: A global comparison between triple quadrupole, Ion trap, and higher energy CID peptide fragmentation spectra. *Journal of proteome research*, 10(9), pp.4334–4341.
- de Gramont, A. et al., 2015. Pragmatic issues in biomarker evaluation for targeted therapies in cancer. *Nature reviews clinical oncology*, 12(2015), pp.197–212.
- Decker, L., Spinal cord structure. Available at: http://mandevillehigh.stpsb.org/teachersites/laura_decker/brain_spinal_and_senses_diagrams.htm.
- Degagné, E. et al., 2014. Sphingosine-1-phosphate lyase downregulation promotes colon carcinogenesis through STAT3-activated microRNAs. *Journal of clinical investigation*, 124(12), pp.5368–5384.
- Diaz Quiroz, J.F. et al., 2014. Precise control of miR-125b levels is required to create a regeneration-permissive environment after spinal cord injury: a cross-species comparison between salamander and rat. *Disease models & mechanisms*, 7(6), pp.601–611.
- Ditunno, J.F. et al., 2004. Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal cord*, 42(7), pp.383–95.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient Analysis Of Experimental Observations. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 20, pp.441–462.
- Domínguez, A. et al., 2013. Central nervous system diseases and the role of the blood-brain barrier in their treatment. *Neuroscience discovery*, 1:3.
- Donnelly, D.J. & Popovich, P.G., 2008. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental neurology*, 209(2), pp.378–88.
- Drucker, E. & Krapfenbauer, K., 2013. Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. *The EPMA journal*, 4(1), p.7.
- E**pstein, F.H., Lipton, S.A. & Rosenberg, P.A., 1994. Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders. *New England Journal of Medicine*, 330(9), pp.613–622.
- F**awcett, J.W. & Asher, R.A., 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain research Bulletin*, 49(6), pp.377–391.
- Fehlings, M.. & Spine Focus Panel, 2001. Summary statement: the use of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *Spine*, 26(24S), p.S55.

- Fehlings, M.G., Vaccaro, A.R. & Boakye, M., 2012. Essentials of spinal cord injury: basic research to clinical practice, *Thieme*.
- Festing, M.F.W., 2014. Randomized block experimental designs can increase the power and reproducibility of laboratory animal experiments. *ILAR Journal*, 55(3), pp.472–476.
- Fink, S.L. et al., 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 73(4), pp.1907–1916.
- Fischer, I. et al., 2011. Sphingosine kinase 1 and sphingosine 1-phosphate receptor 3 are functionally upregulated on astrocytes under pro-inflammatory conditions. *PloS one*, 6(8), p.e23905.
- Fleming, J.C. et al., 2006. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*, 129(12), pp.3249–3269.
- Flynn, J.R. et al., 2011. The role of propriospinal interneurons in recovery from spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 60(5), pp.809–822.
- France-Lanord, V. et al., 1997. Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 69(4), pp.1612–21.
- Fyrst, H. & Saba, J.D., 2010. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nature chemical biology*, 6(7), pp.489–97.
- Galvao, J. et al., 2014. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB Journal*, 28(3), pp.1317–1330.
- García-Pacios, M. et al., 2009. Sphingosine-1-Phosphate as an amphipathic metabolite: its properties in aqueous and membrane environments. *Biophysical journal*, 97, pp.1398–1407.
- Gault, C., Obeid, L. & Hannun, Y., 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Advances in experimental medicine and biology*, pp.1–23.
- Gerber, S. a et al., 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), pp.6940–6945.
- Giorgi, C. et al., 2015. p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(6), pp.2–7.
- Goldin, E. et al., 1992. Type C Niemann-Pick disease: A murine model of the lysosomal cholesterol lipidosis accumulates sphingosine and sphinganine in liver. *Biochimica et biophysica acta*, 1127(3), pp.303–311.
- Gorshkova, I. et al., 2012. Inhibition of serine palmitoyltransferase delays the onset of radiation-induced pulmonary fibrosis through the negative regulation of sphingosine kinase-1 expression. *Journal of lipid research*, 53(8), pp.1553–68.
- Gosejacob, D. et al., 2016. Ceramide synthase 5 is essential to maintain C 16:0 ceramide pools and contributes to the development of diet induced obesity. *Journal of biological chemistry*, p.jbc.M115.691212.
- Gräler, M.H., Bernhardt, G. & Lipp, M., 1998. EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics*, 53(2), pp.164–169.

- Greenhalgh, A.D. & David, S., 2014. Differences in the phagocytic response of microglia and peripheral macrophages after spinal cord injury and its effects on cell death. *The Journal of neuroscience*, 34(18), pp.6316–22.
- Guth, L., Zhang, Z. & Steward, O., 1999. The unique histopathological responses of the injured spinal cord. Implications for neuroprotective therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 890, pp.366–384.
- Hachen, H.J., 1974. Emergency transportation in the event of acute spinal cord lesion. *Paraplegia*, 12(1), pp.33–7.
- Hagen, N. et al., 2009. Subcellular Origin of Sphingosine 1-Phosphate Is Essential for Its Toxic Effect in Lyase-deficient Neurons. *The journal of biological chemistry*, 284, pp.11346–11353.
- Hagen-Euteneuer, N. et al., 2012. Sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase deficiency increases sphingolipid formation via recycling at the expense of de novo biosynthesis in neurons. *The journal of biological chemistry*, 287(12), pp.9128–36.
- Hait, N.C. et al., 2010. Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate. *Science*, 325(5945), pp.1254–1257.
- Hammad, S.M. et al., 2010. Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *Journal of lipid research*, 51(10), pp.3074–87.
- Hande, K.R., 1998. Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European journal of cancer*, 34(10), pp.1514–1521.
- Hannun, Y. & Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), pp.139–50.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E. & Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*, 119, pp.203–210.
- Harada, J. et al., 2004. Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *Journal of neurochemistry*, 88(4), pp.1026–39.
- Harlow, E. & Lane, D., 1988. *Antibodies. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Haughey, N.J. et al., 2004. Perturbation of Sphingolipid Metabolism and Ceramide Production in HIV-Dementia. *Annals of neurology*, 55(2), pp.257–267.
- Hausmann, O.N., 2003. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, 41(7), pp.369–378.
- Hayashi, M. et al., 2000. Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*, 17(3), pp.203–18.
- He, X. et al., 2010. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 31(3), pp.398–408.
- Herr, D.R. & Chun, J., 2007. Effects of LPA and S1P on the nervous system and implications for their involvement in disease. *Current drug targets*, 8(1), pp.155–67.
- Ho Kim, S. & Mo Chung, J., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50(3), pp.355–363.
- Hodgetts, S.I., Plant, G.W. & Harvey, A.R., 2009. Spinal Cord Injury: experimental animal models and relation to human therapy. In Charles Watson, G. Paxinos, & G. Kayalioglu, eds. *The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas*. pp. 209–237.

- Honig, S.M. et al., 2003. FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. *The Journal of clinical investigation*, 111(5), pp.627–37.
- Horrocks, L.A. & Harder, H.W., 1983. Fatty acids and Cholesterol. In A. Lajtha, ed. *Handbook of neurochemistry. Volume 3: Metabolism in the nervous system*. New York: Plenum Press, p. 9.
- Hoschouer, E.L., 2010. Sensory abnormalities in mice after Spinal Cord Injury and the anatomical evidence for likely mechanisms. *The Ohio University*.
- Hsu, C.Y. et al., 1985. Vascular permeability in experimental spinal cord injury. *Journal of the neurological sciences*, 70(3), pp.275–282.
- Hughes, J., 1988. The Edwin Smith Surgical Papyrus: an analysis of the first case reports of spinal cord injuries. *Paraplegia*. Apr;26(2):(2), pp.71–82.
- Hughes, J., Srinivasan, S. & Lynch, K., 2008. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circulation*. 102(8), pp.950–958.
- Hurlbert RJ, 2000. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *Journal neurosurgery*, 93, pp.1–7.
- Ieronimakis, N. et al., 2013. Increased sphingosine-1-phosphate improves muscle regeneration in acutely injured mdx mice. *Skeletal muscle*, 3(1), p.20.
- Jaggi, A.S. & Singh, N., 2013. Intrathecal delivery of farnesyl thiosalicylic acid and GW 5074 attenuates hyperalgesia and allodynia in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Neurological sciences*, 34(3), pp.297–304.
- Jaillard, C. et al., 2005. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *The journal of neuroscience*, 25(6), pp.1459–69.
- Jana, A. & Pahan, K., 2010. Sphingolipids in multiple sclerosis. *Neuromolecular medicine*, 12(4), pp.351–361.
- Janeway CA Jr, P, T. & M., W., 2001. *The Immune System in Health and Disease* 5th editio., New York: Garland Science.
- Johnson, a C., McNabb, a R. & Rossiter, R.J., 1949. Concentration of lipids in the brain of infants and adults. *The biochemical journal*, 44(4), pp.494–8.
- Jones, B.J. & Roberts, D.J., 1968. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 20, pp.302–304.
- Jones, T.B., McDaniel, E.E. & Popovich, P.G., 2005. Inflammatory-mediated injury and repair in the traumatically injured spinal cord. *Current pharmaceutical design*, 11(10), pp.1223–36.
- Kanno, H. et al., 2011. Induction of Autophagy and Autophagic Cell. *Spine*, 36(22), pp.1427–1434.
- Karpnich, N.O. et al., 2002. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *The journal of biological chemistry*, 277(19), pp.16547–16552.
- Katsel, P., Li, A.C. & Haroutunian, A.V., 2007. Gene Expression Alterations in the Sphingolipid Metabolism Pathways during Progression of Dementia and Alzheimer ' s Disease : A Shift Toward Ceramide Accumulation at the Earliest Recognizable Stages of Alzheimer's Disease? *Neurochemistry research*, pp.845–856.

- Kendrick, N., 2012. A gene's mRNA level does not usually predict its protein level. *Www.Kendricklabs.com*, 2, pp.1–6.
- Keul, P. et al., 2011. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circulation research*, 108(3), pp.314–23.
- Kigerl, K.A. et al., 2009. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *The journal of neuroscience*, 29(43), pp.13435–44.
- Kim, M. et al., 2008. Activation of Lck is critically required for sphingosine-induced conformational activation of Bak and mitochondrial cell death q. *Biochemical and biophysical research communications*, 370, pp.353–358.
- Kim, R.H. et al., 2009. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et biophysica acta*, 1791, pp.692–696.
- Kimura, A. et al., 2007. Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 25(1), pp.115–24.
- Kitatani, K. & Luberto, C., 2010. Introduction to tools and techniques for ceramide-centered research. *Advances in experimental medicine and biology*, 688, pp.276–85.
- Kitatani, K. et al., 2016. Sphingolipids in Inflammation: from bench to bedside. *Mediators of inflammation*, 2016, pp.2–4.
- Kolesnick, R., 1994. Signal transduction through the sphingomyelin pathway. *Molecular and chemical neuropathology*, 21, pp.287–297.
- Kraveka, J.M. & Hannun, Y.A., 2009. Bioactive Sphingolipids: An Overview on Ceramide, Ceramide 1-Phosphate Dihydroceramide, Sphingosine, Sphingosine 1-Phosphate. In A. Lajtha, G. Tettamanti, & G. Goracci, eds. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Boston, MA: Springer US, pp. 374–383.
- Kreiner, G., 2015. Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: are the mice better than humans? *Frontiers in cellular neuroscience*, 9(March), pp.1–6.
- Kumar, A. & Saba, J., 2009. Lyase to live by: sphingosine phosphate lyase as a therapeutic target. *Expert opinion on therapeutic targets*, 13(8), pp.1013–1025.
- Laemmli, U.K. (1970):, 1970. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227, pp.680–685.
- Lassota, P., Singh, G. & Kramer, R., 1996. Mechanism of Topoisomerase II Inhibition by Staurosporine and Other Protein Kinase Inhibitors. *Journal of biological chemistry*, 271(42), pp.26418–26423.
- Laviad, E.L. et al., 2008. Characterization of ceramide synthase 2: Tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *Journal of biological chemistry*, 283(9), pp.5677–5684.
- Le, M.T.N. et al., 2009. MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets. *Molecular and cellular biology*, 29(19), pp.5290–305.
- Lee, B.B. et al., 2013. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal cord*, (February 2012), pp.1–7.
- Lee, H. et al., 2013. 4-deoxypyridoxine improves the viability of isolated pancreatic islets ex vivo. *Islets*, 5(3), pp.116–121.

- Lee, K.D. et al., 2009. FTY720 reduces inflammation and promotes functional recovery after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*, 26(12), pp.2335–44.
- Levade, T. et al., 2001. Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circulation research*, pp.957–968.
- Liebler, D.C. & Zimmerman, L.J., 2013. Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry. *Biochemistry*, 52(22), pp.3797–3806.
- Lin, C.-I. et al., 2007. Sphingosine 1-phosphate regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through S1P1 and S1P3. *Biochemical and biophysical research communications*, 355(4), pp.895–901.
- Liu, D. et al., 2000. The Role of Reactive Nitrogen Species in Secondary Spinal Cord Injury. *Journal of Neurochemistry*, 75(5), pp.2144–2154.
- Liu, N.-K. & Xu, X.-M., 2006. β -Tubulin Is a More Suitable Internal Control than β -Actin in Western Blot Analysis of Spinal Cord Tissues after Traumatic Injury. *Journal of neurotrauma*, 23(12), pp.1794–1801.
- Liverman, C. et al., 2005. *Spinal Cord injury: progress, promise and priorities* C. on S. C. Injury, ed., Washington, D.C.
- Loetscher, E. et al., 2013. Assay to measure the secretion of sphingosine-1-phosphate from cells induced by S1P lyase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications*, 433(3), pp.345–8.
- Łuszczki, J.J., 2010. Dose-response relationship analysis of pregabalin doses and their antinociceptive effects in hot-plate test in mice. *Pharmacological reports*, 62(5), pp.942–8.
- M**aceyka, M. & Spiegel, S., 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*, 510(7503), pp.58–67.
- Malik, F.A. et al., 2015. Sphingosine-1-Phosphate is a novel regulator of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Activity. *PloS one*, 10(6), pp.1–15.
- Mayeux, R., 2004. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(2), pp.182–8.
- Mayo, L. et al., 2015. Inflammation. *Nature medicine*, 20(10), pp.1147–1156.
- McLeod, A., 2004. Traumatic injuries to the head and spine 1: mechanisms of injury. *British journal of nursing*, 13(16), p.940–947 8p.
- Meng, X.-Y. et al., 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), pp.146–57.
- Merrill, A.H. et al., 1993. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *Journal of biological chemistry*, 268(36), pp.27299–27306.
- Merrill, A.H. et al., 1997. Sphingolipids — The Enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology 1. *Toxicology and applied pharmacology*, 225(142), pp.208–225.
- Merrill, A.H., 2002. Biosynthesis: A necessary, but dangerous, pathway. *The journal of biological chemistry*, 277(29), pp.25843–25846.
- Merrill, A.H., 2011. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chemical reviews*, 111(10), pp.6387–422.
- Merscher, S. & Fornoni, A., 2014. Podocyte pathology and nephropathy – sphingolipids in glomerular diseases. *Frontiers in endocrinology*, 5(July), pp.1–11.

- Michel, C. et al., 1997. Characterization of Ceramide Synthesis. *Journal of biological chemistry*, 272(36), pp.22432–22437.
- Miyake, Y. et al., 1995. Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochemical and biophysical research communications*, 211(2), pp.396–403.
- Mizugishi, K. et al., 2005. Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development. *Molecular and cellular biology*, 25(24), pp.11113–11121.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, pp.55–63.
- N**agahashi, M. et al., 2013. Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network. *The FASEB Journal*, 27(3), pp.1001–1011.
- Nakahara, S. et al., 2002. Changes in nitric oxide and expression of nitric oxide synthase in spinal cord after acute traumatic injury in rats. *Journal of neurotrauma*, 19(11), pp.1467–1474.
- Nam, C., Doi, K. & Nakayama, H., 2010. Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway. *Histology and histopathology*, 25(4), pp.485–493.
- Natale, J.E. et al., 2003. Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 20(10), pp.907–27.
- Nayak, D. et al., 2010. Sphingosine kinase 1 regulates the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide in activated microglia. *Neuroscience*, 166(1), pp.132–144.
- Nixon, G.F., 2009. Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *British journal of pharmacology*, 158, pp.982–993.
- Noble, L.J. & Wrathall, J.R., 1989. Distribution and time course of protein extravasation in the rat spinal cord after contusive injury. *Brain research*, 482(1), pp.57–66.
- Norimatsu, Y. et al., 2012. FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. *The American journal of pathology*, 180(4), pp.1625–35.
- O**beid, L.M. et al., 1993. Programmed Cell Death Induced by Ceramide. *Science*, 259(5102), pp.1769–1771.
- Ohtoyo, M. et al., 2014. Sphingosine 1-phosphate lyase inhibition by 2-acetyl-4-(tetrahydroxybutyl)imidazole (THI) under conditions of vitamin B6 deficiency. *Molecular and cellular biochemistry*, 400(1–2), pp.125–133.
- Okada, S. et al., 2006. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nature medicine*, 12(7), pp.829–834.
- Olney, J.W., 1969. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *Journal of neuropathology & experimental neurology*, 28, pp.455–474.
- OMS, 2013. Lesiones Medulares. *Nota descriptiva No384*.
- Ong, D.E. & Brady, R.N., 1973. In vivo studies on the introduction of the 4-t-double bond of the sphingenine moiety of rat brain ceramides. *The journal of biological chemistry*, 248(11), pp.3884–8.

- Osawa, Y. et al., 2005. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor? *Journal of biological chemistry*, 280(30), pp.27879–27887.
- Oyinbo, C.A., 2011. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 71(2), pp.281–99.
- P**ahan, K. et al., 1998. Sphingomyelinase and Ceramide Stimulate the Expression of Inducible Nitric-oxide Synthase in Rat Primary Astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 273(5), pp.2591–2600.
- Pannu, R. et al., 2004. A novel role of lactosylceramide in the regulation of lipopolysaccharide/interferon-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: implications for neuroinflammatory diseases. *Journal of neuroscience*, 24, pp.5942–5954.
- Pannu, R., Singh, A.K. & Singh, I., 2005. A novel role of lactosylceramide in the regulation of tumor necrosis factor alpha-mediated proliferation of rat primary astrocytes. Implications for astrogliosis following neurotrauma. *The journal of biological chemistry*, 280, pp.13742–13751.
- Park, S.M. et al., 2014. Sphingosine-1-phosphate lyase is expressed by CD68+ cells on the parenchymal side of marginal reticular cells in human lymph nodes. *European Journal of immunology*, 44(8), pp.2425–2436.
- Patti, G.J. et al., 2012. Metabolomics implicates altered sphingolipids in chronic pain of neuropathic origin. *Nature chemical biology*, 8(3), pp.232–234.
- Pekny, M. & Pekna, M., 2014. Astrocyte Reactivity and Reactive Astrogliosis: Costs and Benefits. *Physiological reviews*, 94(4), pp.1077–1098.
- Picotti, P. & Aebersold, R., 2012. Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nature methods*, 9(6), pp.555–566.
- Plášek, J. et al., 1996. *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*. In J. Slavík, ed. New York: Plenum Press, pp. 113–119.
- Podbielska, M., Levery, Steven B. & Hogan, E.L., 2011. The structural and functional role of myelin fast-migrating cerebroside: pathological importance in multiple sclerosis. *Journal of clinical lipidology*, 6(2), pp.159–179.
- Prager, B., Spampinato, S.F. & Ransohoff, R.M., 2015. Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier. *Trends in molecular medicine*, 21(6), pp.354–363.
- Profyris, C. et al., 2004. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of disease*, 15(3), pp.415–36.
- Pulkoski-gross, M.J., Donaldson, J.C. & Obeid, L.M., 2015. Sphingosine-1-phosphate metabolism: A structural perspective. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 0(0), pp.1–16.
- Pyne, S. & Pyne, N.J., 2000. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochemistry*, 402, pp.385–402.
- Q**in, J. et al., 2010. Neurons and oligodendrocytes recycle sphingosine 1-phosphate to ceramide: Significance for apoptosis and multiple sclerosis. *Journal of biological chemistry*, 285(19), pp.14134–14143.
- Qiu, M. & Liu, X., 2001. Determination of sphinganine, sphingosine and Sa/So ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B 1. *Food additives and contaminants*, 18(3), pp.263–269.

Quencer, R., 2002. Advances in imaging of spinal cord injury: implications for treatment and patient evaluation. *Progress in brain research*, 137, pp.3–8.

Radevick, S., 2009. Sphingolipidosis.

Available at: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sphingolipidoses.svg>.

Rago, R. et al., 1991. Disruption of cellular energy balance by suramin in intact human prostatic carcinoma cells, a likely antiproliferative Mechanism. *Cancer*, 51, pp.6629–6635.

Reigada, D. et al., 2015. Acute administration of ucf-101 ameliorates the locomotor impairments induced by a traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 300, pp.404–17.

Riley et al., 1993. Alteration of Tissue and Serum Sphinganine to Sphingosine Ratio: An Early Biomarker of Exposure to Fumonisin-Containing Feeds in Pigs. *Toxicology and applied pharmacology*, pp.105–112.

Rosen, H. et al., 2009. Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annual review of biochemistry*, 78, pp.743–68.

Saba, J.D. & Hla, T., 2004. Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circulation research*, 94(6), pp.724–34.

Saba, J.D., 2006. Sphingosine-1-Phosphate Lyase. *Sphingolipid biology*. pp.219–230.

Sandhoff, K., 2013. Metabolic and cellular bases of sphingolipidoses. *Biochemical Society Transactions*, 41, pp.1562–1568.

Sanllehí, P. et al., 2015. Inhibitors of sphingosine-1-phosphate metabolism (sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate lyase). *Chemistry and physics of lipids*, 197, pp.69-81.

Schmahl, J., Raymond, C.S. & Soriano, P., 2007. PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nature genetics*, 39(1), pp.52–60.

Schneider, P.B. & Kennedy, E.P., 1968. Metabolism of labeled dihydrosphingomyelin in vivo. *Journal of lipid research*, 9(1), pp.58–64.

Schwab, J.M. et al., 2000. Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. *Journal of neuroimmunology*, 111(1–2), pp.122–130.

Schwab, S.R. et al., 2005. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science (New York, N.Y.)*, 309, pp.1735–1739.

Sebaugh, J.L., 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics*, 10(2), pp.128–134.

Senkal, C.E. et al., 2010. Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways. *The FASEB journal*, 24(1), pp.296–308.

Seumois, G. et al., 2007. De novo C16- and C24-ceramide generation contributes to spontaneous neutrophil apoptosis. *Journal of leukocyte biology*, 81(6), pp.1477–86.

Sharma, S. et al., 2011. Fingolimod (FTY720): First approved oral therapy for multiple sclerosis. *Molecules of the Millennium*, 2(1), pp.49–52.

Shearman, M.S., Hawtin, S.R. & Taylor, V.J., 1995. The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by b-amyloid peptides. *Journal of neurochemistry*, 65(1), pp.218–227.

- Shrivastava, A. & Gupta, V.B., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of young scientists*, 2(1), pp.21–25.
- Singh, I. et al., 1998. Cytokine-mediated Induction of Ceramide Production Is Redox-sensitive. *The journal of biological chemistry*, 273(32), pp.20354–20362.
- Sinkeldam, E.J., Groo, A.P.D.E. & Berg, H., 1988. The effect of pyridoxine on the number of lymphocytes in the blood of rats fed caramel colour (III). *Food and chemical toxicology*, 26(3), pp.195–203.
- Snider, A.J., Orr Gandy, K.A. & Obeid, L.M., 2010. Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. *Biochimie*, 92(6), pp.707–15.
- Spiegel, S. & Kolesnick, R., 2002. Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia*, 16(9), pp.1596–1602.
- Spiegel, S. & Milstien, S., 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Molecular cell biology*, 4(May), pp.397–407.
- Spiegel, S., 1999. Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *Journal of leukocyte biology*, 65(3), pp.341–344.
- Spohr, T. et al., 2012. Sphingosine 1-phosphate-primed astrocytes enhance differentiation of neuronal progenitor cells. *Journal of neuroscience research*, 90(10), pp.1892–902.
- Sroga, J.M. et al., 2003. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *The journal of comparative neurology*, 462(2), pp.223–40.
- Stoffel, W. & Grol, M., 1974. Chemistry and biochemistry of 1-desoxysphinganine 1-phosphonate (dihydrosphingosine-1-phosphonate). *Chemistry and physics of lipids*, 13(4), pp.372–88.
- Stoffel, W., LeKim, D. & Sticht, G., 1969. Distribution and properties of dihydrosphingosine-1-phosphate aldolase (sphinganine-1-phosphate alkanal-lyase). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 350, pp.1233–1241.
- Strader, C.R., Pearce, C.J. & Oberlies, N.H., 2011. Fingolimod (FTY720): A recently approved multiple sclerosis drug based on a fungal secondary metabolite. *Journal of natural products*, 74(4), pp.900–907.
- Strub, G., Maceyka, M. & Hait, N., 2010. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Advances in experimental medicine and biology*, pp.141–155.
- Svennerholm, L. & Stallberg-stenhagen, S., 1968. Changes in the fatty acid composition of cerebroside and sulfatides of human nervous tissue with age. *The journal of lipid research*, 9, pp.215–225.
- Taha, T. a, Mullen, T.D. & Obeid, L.M., 2006. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(12), pp.2027–36.
- Takabe, K. et al., 2008. “Inside-Out” Signaling of Sphingosine-1-Phosphate: therapeutic targets. *Pharmacological reviews*, 60(2), pp.181–195.
- Takuwa, Y. et al., 2010. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World journal of biological chemistry*, 1(10), pp.298–306.
- Taoka, Y. et al., 1997. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, 79(4), pp.1177–1182.
- Tator, C. et al., 1993. Changes in epidemiology of acute spinal cord injury from 1947 to 1981. *Surgical neurology*, 40(3), pp.207–215.

- Tator, C.H., 1995. Update on the Pathophysiology and Pathology of Acute Spinal Cord Injury. *Brain pathology*, 5(4), pp.407–413.
- Tedesco-silva, H. et al., 2007. FTY720 versus mycophenolate mofetil in de Novo renal transplantation : six-month results of a double-blind study. *Experimental transplantation*, 84(7), pp.885–892.
- The Ohio State University, 2007. *NINDS Spinal Cord Injury Training Program*, Columbus, OH.
- Triola, G. et al., 2004. Specificity of the dihydroceramide desaturase inhibitor N-cyclopropenyl ethyl]octanamide (GT11) in primary cultured cerebellar neurons. *Molecular pharmacology*, 66(6), pp.1671–1678.
- Trivedi, A., Olivas, A.D. & Noble-Haeusslein, L.J., 2007. Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes. *Clinical neuroscience research*, 6(5), pp.283–292.
- V**an Doorn, R. et al., 2012. Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. *Journal of neuroinflammation*, 9, p.133.
- van Echten, G., Birk, R. & G Brenner-Weiss, R.R., 1990. Modulation of sphingolipid biosynthesis in primary cultured neurons by long chain. *Journal of biological chemistry*, 265, pp.9333–9339.
- Varga, E. et al., 2012. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(9), pp.2675–2686.
- Veldhoven, P.P. Van, 2005. Sphingosine 1-phosphate lyase deficient mice. *Chemistry and physics of lipids*, 136, pp.164–165.
- Van Veldhoven, P.P. & Mannaerts, G.P., 1991. Subcellular Localization and Membrane Topology of Sphingosine- 1- phosphate Lyase in Rat Liver. *The Journal of biological chemistry*, 266(19), pp.12502–12507.
- Venkataraman, K. et al., 2002. Upstream of growth and differentiation factor 1 (uog1), a mammalian homolog of the yeast longevity assurance gene 1 (LAG1), regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisins B1-independent manner in mammalian cells. *Journal of biological chemistry*, 277(38), pp.35642–35649.
- Vogel, P. et al., 2009. Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PloS one*, 4(1), p.e4112.
- W**adsworth, J.M. et al., 2013. The chemical basis of serine palmitoyltransferase inhibition by myriocin. *Journal of the American Chemical Society*, 135(38), pp.14276–14285.
- Wang, E. et al., 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *The journal of biological chemistry*, 266, pp.14486–14490.
- Wang, M., Master, S.R. & Chodosh, L. a, 2006. Computational expression deconvolution in a complex mammalian organ. *BMC bioinformatics*, 7, p.328.
- Warden, P. et al., 2001. Delayed glial cell death following wallerian degeneration in white matter tracts after spinal cord dorsal column cordotomy in adult rats.PG. *Experimental neurology*, 168(2), pp.213–224.
- Weigert, A. et al., 2010. Cleavage of sphingosine kinase 2 by caspase-1 provokes its release from apoptotic cells. *Immunobiology*, 115(17), pp.3531–3540.
- Weiler, S. et al., 2014. Orally active 7 substituted (4-Benzylphthalazin-1-yl)-2-methylpiperazin-1-yl]nicotinonitriles as active-site inhibitors of sphingosine 1 phosphate lyase for the treatment of multiple sclerosis. *The journal of medicinal chemistry*. 57, pp.5074-5084.

- Winkler, E.A. et al., 2014. Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), pp.E1035-42.
- Won, J. et al., 2004. The role of neutral sphingomyelinase produced ceramide in lipopolysaccharide-mediated expression of inducible nitric oxide synthase. *Journal of neurochemistry*, 88, pp.583–593.
- Wu, Y.-P. et al., 2008. Sphingosine kinase 1/S1P receptor signaling axis controls glial proliferation in mice with Sandhoff disease. *Human molecular genetics*, 17(15), pp.2257–64.
- Ye, X. et al., 2010. Dietary intake of Vitamin B-6, plasma pyridoxal 5'-phosphate, and homocysteine in puerto rican adults. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(11), pp.1660–1668.
- Young, M.M., Kester, M. & Wang, H.-G., 2013. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *Journal of lipid research*, 54(1), pp.5–19.
- Yunta, M. et al., 2012. MicroRNA dysregulation in the spinal cord following traumatic injury. *PloS one*, 7(4), p.e34534.
- Zhan, X. & Desiderio, D.M., 2006. Nitroproteins from a human pituitary adenoma tissue discovered with a nitrotyrosine a Y nity column and tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 354, pp.279–289.
- Zhang, H. et al., 1991. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *The journal of cell biology*, 114, pp.155–167.
- Zhang, H. et al., 2011. Methods for peptide and protein quantitation by liquid chromatography-multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics*, 10(6), p.M110.006593.
- Zhang, J. et al., 2009. Treatment with Immunosuppressants FTY720 and Tacrolimus Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 219(4), pp.295–302.
- Zhao, L. et al., 2015. Elevation of 20-carbon long chain bases due to a mutation in serine palmitoyltransferase small subunit b results in neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(42), pp.12962–7.
- Zhao, Y. et al., 2011. Protection of LPS-induced murine acute lung injury by sphingosine-1-phosphate lyase suppression. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 45(2), pp.426–435.
- Zhou, X., He, X. & Ren, Y., 2014. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural regeneration research*, 9(20), pp.1787–1795.
- Zöller, I. et al., 2008. Absence of 2-Hydroxylated Sphingolipids Is Compatible with Normal Neural Development But Causes Late-Onset Axon and Myelin Sheath Degeneration. *The journal of neuroscience*, 28(39), pp.9741–9754.

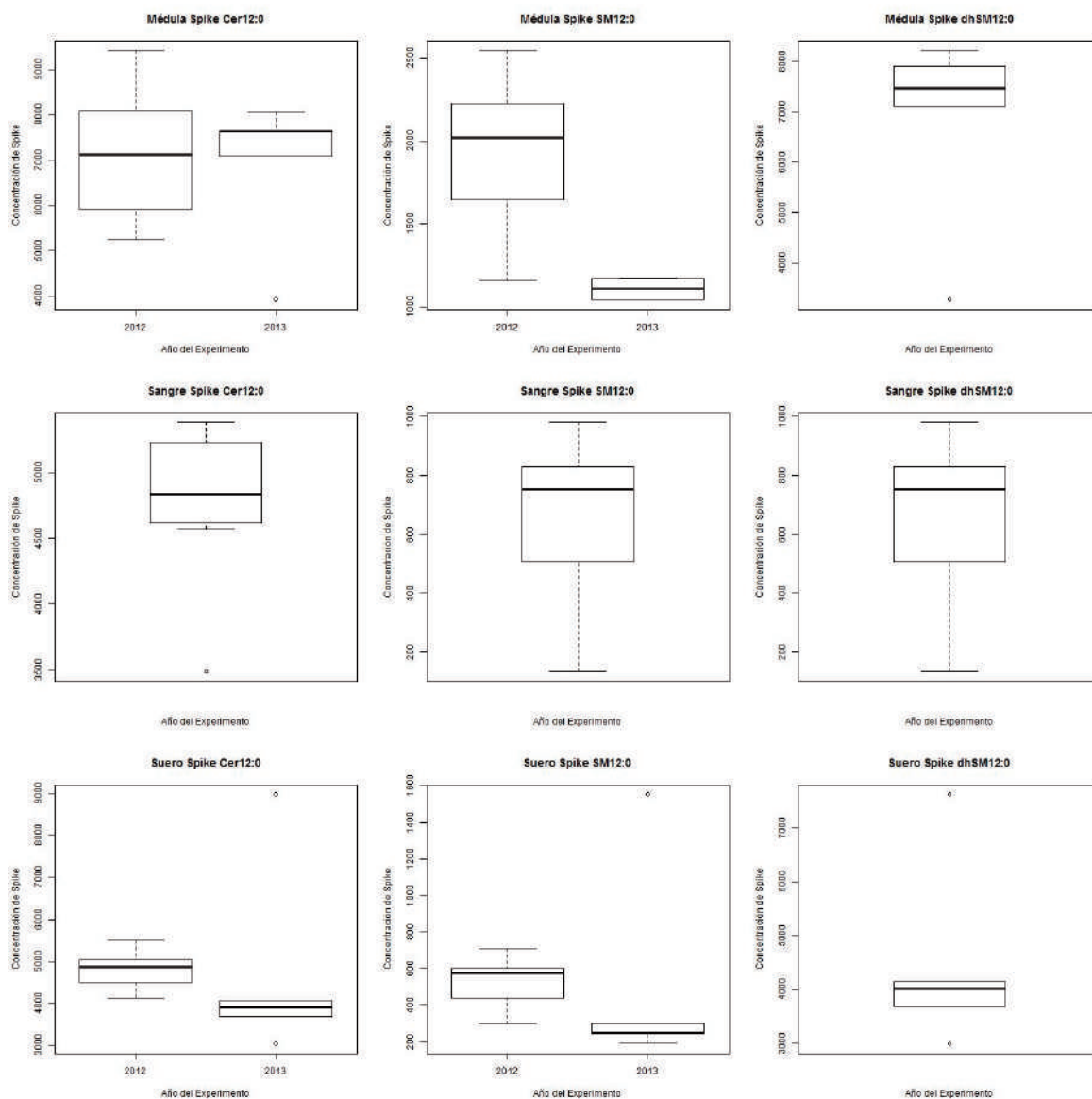
MATERIAL SUPLEMENTARIO

Médula espinal																											
Muestras año 2012																	Muestras año 2013										
Ácido graso	m/z	R.T. (min)	21 días			7 días			3 días			1 día			Control			7 días					3 días			1 día	
			WT_252	WT_253	WT_254	WT_255	WT_256	WT_257	WT_258	WT_259	WT_260	WT_261	WT_262	WT_263	WT_264	WT_265	WT_266	#2	#7	#8	#11	#12					
Esfingomielinas																											
12:0	647,513	5,05	2020	1554	2546	1482	1962	2122	2424	2175	1154	2290	1930	2280	1711	1585	2146	N.D.	1042	1172	1166	1048					
14:0	675,544	6	491	321	426	393	745	488	807	609	359	286	261	455	510	484	518	N.D.	243	362	387	386					
14:1	673,528	5,2	5	2	3	3	4	3	5	4	3,0	3	1	2	3	2	4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.					
16:0	703,575	7,26	14752	7958	13256	6264	10506	8358	14266	14973	11010	6414	5014	5838	4615	5133	5730	N.D.	3368	5334	170	4049					
16:1	701,560	6,3	293	156	228	108	163	141	332	349	223	137	105	112	92	96	101	N.D.	72	121	79	77					
18:0	731,607	8,73	40927	34316	40068	34589	44173	39454	44951	44463	35356	29491	25868	33526	33046	38375	36399	N.D.	16596	21303	23688	23214					
18:1	729,591	7,75	1319	925	1324	979	1067	1716	1893	1449	903	588	711	1090	1567	1523	1170	N.D.	77	114	124	560					
20:0	759,638	10,1	13122	10501	11473	10562	12614	11881	11641	13514	11104	10054	8747	11291	10224	11416	11347	N.D.	7083	9290	11557	11379					
20:1	757,622	9,1	471	355	414	361	537	483	588	550	400	352	348	472	514	486	472	N.D.	265	359	533	566					
22:0	787,669	11,4	15079	10434	11156	11974	10579	10672	12120	13176	12701	10215	9842	11598	10114	10665	9916	N.D.	16427	18869	20980	19456					
22:1	785,654	10,4	12582	10230	10692	10673	13886	11679	12958	13374	10818	10051	9425	11531	11757	11438	11207	N.D.	8500	11217	13752	12181					
22:2	783,638	9,4	153	115	138	130	225	180	215	199	140	115	121	168	183	159	152	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.					
24:0	815,701	12,6	26083	19242	19395	17003	23718	17883	25808	26629	20571	17612	16256	20391	17600	20343	19912	N.D.	14826	18254	21593	19719					
24:1	813,685	11,55	51277	39238	40602	42867	43905	42413	45582	46572	43842	36825	34402	38790	38844	38194	37029	N.D.	8679	8375	9207	14430					
24:2	811,669	10,67	2798	1104	1474	2129	2491	2474	3327	3024	2356	1761	1592	2149	2029	1849	1593	N.D.	2611	3445	3045	4402					
24:3	809,654	9,90	105	66	71	56	87	79	88	101	64	58	49	64	59	67	56	N.D.	266	382	510	501					
Dihidroesfingomielinas																											
SM12:0	647,513	5,05	2020	1554	2546	1482	1962	2122	2424	2175	1154	2290	1930	2280	1711	1585	2146	3276	8219	7902	7472	7114					
14:0	677,560	6,45	17	13	16	8	24	16	24	22	13	9	13	13	13	15	13	21	130	150	161	180					
16:0	705,591	7,81	706	283	547	289	511	393	1033	1127	537,0	337	261	304	213	193	245	1350	5684	6493	4252	4208					
18:0	733,622	9,24	4527	3442	4245	3890	5753	5075	5894	6105	4093	3402	2897	4474	3661	4040	4421	91	15606	16915	16831	17078					
20:0	761,654	10,58	723	326	396	507	732	822	1088	1101	669	504	479	945	557	724	520	44	2789	2772	3122	3239					
22:0	789,685	11,84	4407	2276	2671	3497	3557	3741	4199	4411	3643	3037	3093	3823	3293	3714	3086	272	6226	6039	6448	5616					
24:0	817,716	12,99	3939	2474	2532	1663	4047	2583	4017	4062	2468	2300	2187	3013	2365	2727	3080	199	5751	6512	4369	3899					
24:1	815,701	11,98	7291	4475	4608	5828	7724	8177	9808	8324	6320	5771	5215	6886	6832	6442	6148	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.					
Ceramidas																											
12:0	482,457	5,15	5237	5459	7164	6162	5812	7939	7829	7108	5761	9417	6028	8740	8193	6608	8538	3914	7634	8062	7653	7089					
14:0	510,489	6,04	78	71	86	63	103	73	133	180	137	147	71	117	80	34	101	N.D.	92	131	73	65					
14:1	508,473	5,13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.					
16:0	538,520	7,28	3611	3547	4003	2671	4450	3095	4797	8262	7734	5702	2088	3721	1321	328	2486	90	2496	3973	2123	2284					
16:1	536,504	6,67	230	197	213	162	229	205	483	758	699	312	134	234	114	32	161	2	199	73	132	19					
18:0	566,551	8,74	9279	10562	11925	11447	13041	11820	13988	18991	18692	19020	11904	14317	13453	7768	14997	26	11956	15274	8387	9773					
18:1	564,536	8,00	1220	1586	2148	1853	1766	2389	2832	3556	3127	3013	604	2165	3344	925	3020	1	1032	1468	868	990					
20:0	594,583	10,3	447	455	452	570	398	417	610	694	979	940	670	591	489	416	497	30	1419	1555	875	954					
20:1	592,567	9,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	508	546	457	474					
22:0	622,614	11,60	258	245	247	320	211	181	291	328	361	375	386	382	302	256	306	320	896	986	822	789					
22:1	620,598	10,50	180	167	177	236	194	164	352	371	355	302	239	301	300	174	295	N.D.	847	943	645	749					
22:2	620,598	10,70	20	25	50	45	31	40	42	52	51	35	30	40	25	20	35	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.					
24:0	650,645	12,7	2546	2313	2201	2601	1817	1430	2498	3010	2753	2739	2353	2927	2266	1688	2486	913	2455	3095	2098	1764					
24:1	648,630	11,7	2114	2518	2877	2862	2495	2262	3392	4188	3542	3526	2534	3263	3223	1923	3441	796	3574	4005	3566	4265					
24:2	648,630	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.					
24:3	646,614	11	164	210	182	203	175	193	219	305	354	253	134	167	138	67	168	63	682	843	730	831					
Dihidroceramidas																											
Cer12:0	482,457	5,15	5237	5459	7164	6162	5812	7939	7829	7108	5761	9417	6028	8740	8193	6608	8538	3914	7634	8062	7653	7089					
14:0	512,504	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	22	101	145	78	89					
16:0	540,536	8	110	65	82	65	95	62	145	175	138	109	75	71	29	16	55	N.D.	300	306	170	256					
18:0	568,567	9,3	118	101	129	218	113	107	265	245	281	229	230	190	143	102	143	N.D.	156	157	85	102					
20:0	596,598	10,7	8	6	8	30	10	8	30	21	11	24	31	23	19	13	18	N.D.	206	207	103	118					
22:0	624,627	11,9	35	22	27	87	39	35	85	92	105	75	100	93	74	59	65	34	201	215	193	168					
24:0	652,661	13	147	113	103	182	88	70	163	179	279	186	179	189	121	100	114	70	197	185	100	69					
24:1	650,645	12	109	92	118	127	127	130	214	254	222	181	206	214	202	145	201	54	963	1165	976	1085					
Glucosil o galactosil Ceramidas																											
12:0	644,510	4,9	2286	2297	2877	1901	1565	2030	1874	1851	1651	3969	2330	2992	1754	1677	2324	2453	3163	2732	2636	2418					
14:0	672,542	5,8	51	45	49	57	78	58	77	69	60	86	84	83	79	87	78	18	233	230	210	231					
16:0	700,573	6,8	1608	1041	1540	1220	2094	1479	2137	2444	1625	1222	1166	1874	1839	1725	2000	234	1650	1968	1986	1992					
18:0	728,604	8,2	25071	22304	24136	22446	25088	23267	25542	24533	23315	22106	20723	24505	23725	25516	25854	54	26322	28230	29275	26241					
20:0	756,635	9,6	8431	8021	8297	8957	7971	7933	8931	8197	7231	7624	7864	8367	8214	7875	8468	80	9680	10681	10883	10416					
22:0	784,667	10,9	7213	6862	6839	8011	6124	6492	7329	6288	6733	6324	6962	6844	6542	6317	6166	406	13217	14225	13494	13240					
22:1	782,651	10	10645	9799	10314	10175	12015	10623	11010	11398	9585	10088	10513	11641	12369	11779	12365	34	14945	16122	16654	17396					
24:0	812,698	12,2	23806	21492	20168	22937	21803	20240	23571	22886	21905	21069	20541	23016	21196	22845	21272	371	30424	32014	30475	27469					
24:1	810,682	11,1	26524	25160	25250	26618	276731																				

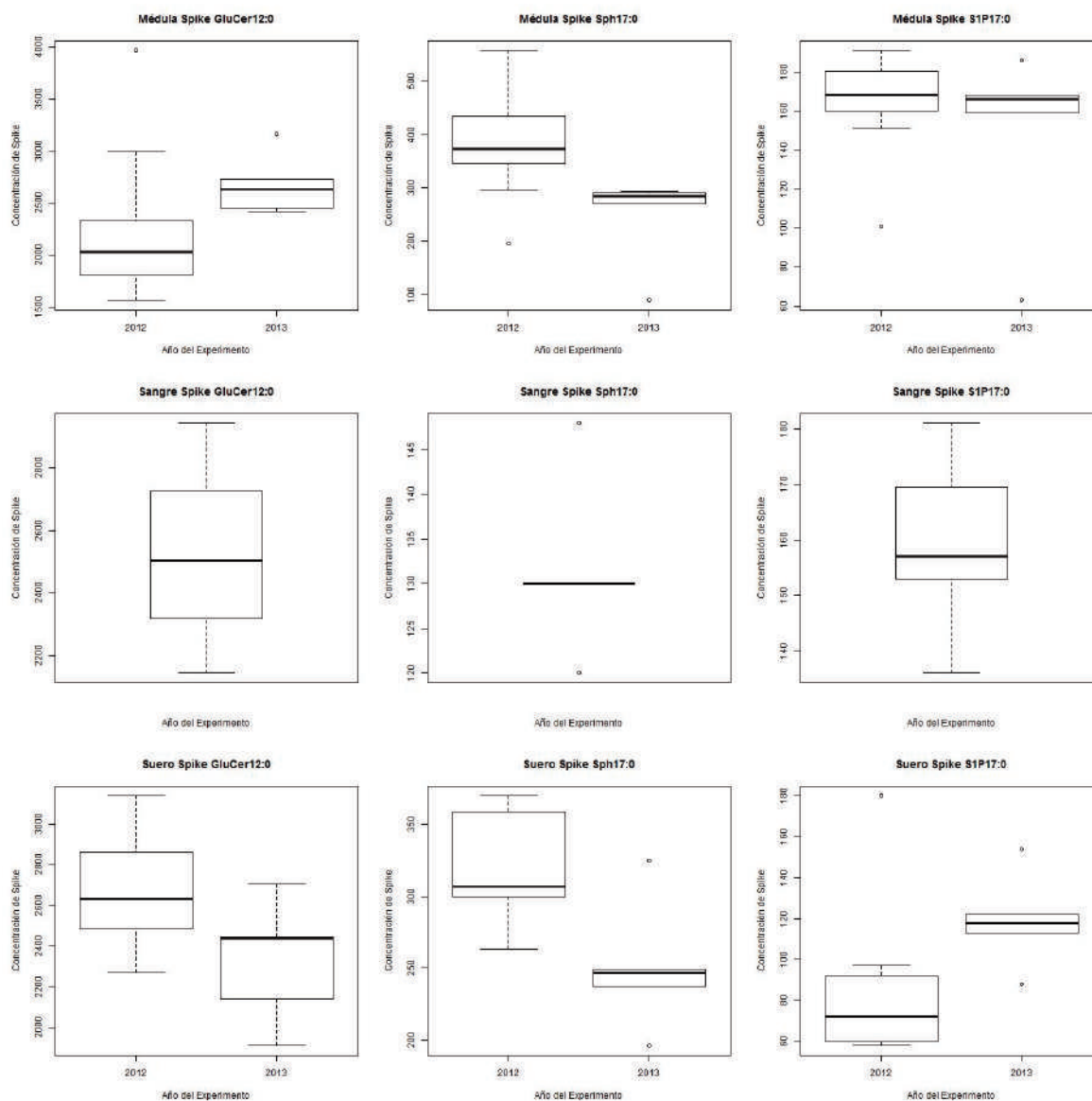
Sangre																	
Muestras año 2012																	
Ácido graso	m/z	R.T. (min)	21 días			7 días			3 días			1 día			Control		
			WT_252	WT_253	WT_254	WT_255	WT_256	WT_257	WT_258	WT_259	WT_260	WT_261	WT_262	WT_263	WT_264	WT_265	WT_266
Esfingomielinas																	
12:0	647,513	5,05	669	453	498	516	980	844	834	396	753	831	765	134	825	803	674
14:0	675,544	6	122	115	107	138	251	160	239	112	237	669	638	175	221	238	236
14:1	673,528	5,2	9	8	8	11	12	11	15	9	14,0	50	37	14	17	19	17
16:0	703,575	7,26	11276	9267	11858	15675	17528	12775	20078	14816	18084	20646	22337	8982	14638	16471	14450
16:1	701,560	6,3	680	603	416	533	1117	958	1598	422	1488	2083	2269	367	1339	1421	1124
18:0	731,607	8,73	2761	2339	1746	3165	3437	2987	4780	2348	4424	5156	5478	998	3401	3435	3085
18:1	729,591	7,75	217	200	191	238	216	203	428	239	427	621	661	282	287	307	248
20:0	759,638	10,1	1545	1395	992	1638	2615	1864	2405	1003	2322	2353	2670	396	2216	2416	2074
20:1	757,622	9,1	165	144	121	152	142	122	200	111	194	208	279	87	143	146	131
22:0	787,669	11,4	7159	5548	7093	9412	10840	8461	10860	7541	10011	10234	10411	3151	9886	10746	9730
22:1	785,654	10,4	1198	1105	855	1734	2271	1953	2681	988	2192	2611	3019	469	2441	2759	2322
22:2	783,638	9,4	153	141	111	184	205	158	214	151	223	164	234	74	144	132	135
24:0	815,701	12,6	12890	10286	15513	18570	20331	15121	19058	14446	17816	20325	19940	6612	18664	20093	18476
24:1	813,685	11,55	9794	7934	11551	15768	16266	13002	16061	11068	15491	20688	22031	10090	15770	17449	15177
24:2	811,669	10,67	4596	4231	4774	8404	11864	8437	10392	5743	9479	11431	11480	2709	10629	11319	9864
24:3	809,654	9,90	303	314	209	383	559	422	538	245	520	536	608	140	539	525	465
Dihidrosfingomielinas																	
SM12:0	647,513	5,05	669	453	498	516	980	844	834	396	753	831	765	134	825	803	674
14:0	677,560	6,45	4	1	3	1	8	3	8	1	7	28	40	16	3	4	3
16:0	705,591	7,81	604	591	323	787	763	429	986	563	842,0	722	1260	422	658	658	635
18:0	733,622	9,24	196	163	145	301	306	198	267	248	262	251	309	102	189	202	192
20:0	761,654	10,58	68	87	44	84	169	66	129	54	114	106	124	22	106	107	100
22:0	789,685	11,84	228	295	226	535	918	438	664	396	563	475	537	196	476	624	416
24:0	817,716	12,99	289	236	217	227	512	270	449	143	348	3087	388	74	324	357	284
24:1	815,701	11,98	723	632	894	1866	2030	1220	1896	1239	1799	2160	2977	961	1922	2024	1771
Ceramidas																	
12:0	482,457	5,15	4613	4572	4880	4594	4626	5356	4833	5162	5378	4697	4725	3489	5367	5291	5024
14:0	510,489	6,04	3	5	3	6	7	6	7	5	6	13	11	9	8	9	7
14:1	508,473	5,13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16:0	538,520	7,28	278	281	357	383	481	314	436	433	712	497	626	383	406	351	334
16:1	536,504	6,67	8	9	10	31	27	4	12	10	14	18	25	16	14	15	22
18:0	566,551	8,74	142	165	167	146	106	127	168	187	194	103	123	104	178	65	68
18:1	564,536	8,00	7	11	9	3	2	2	4	4	4	2	4	3	3	1	1
20:0	594,583	10,3	132	171	158	245	232	220	164	147	163	122	146	110	228	109	112
20:1	592,567	9,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
22:0	622,614	11,60	943	1006	881	1332	1315	1128	1146	1196	1139	838	892	706	1212	693	756
22:1	620,598	10,50	26	27	29	43	39	45	34	29	27	37	28	25	63	24	27
22:2	620,598	10,70	45	38	48	57	47	50	48	43	38	34	41	35	56	43	45
24:0	650,645	12,7	4937	5497	4766	7337	6116	5871	6821	6095	6345	5658	5901	3887	6778	5495	5454
24:1	648,630	11,7	1206	1301	1338	2029	1875	1785	1914	2044	2152	2072	2067	1735	1930	1695	1665
24:1	648,630	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
24:2	646,614	11	192	194	243	355	313	323	303	395	402	387	409	247	414	261	273
Dihidroceraidas																	
Cer12:0	482,457	5,15	4613	4572	4880	4594	4626	5356	4833	5162	5378	4697	4725	3489	5367	5291	5024
14:0	512,504	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16:0	540,536	8	105	101	110	53	47	37	56	49	46	30	45	51	41	30	38
18:0	568,567	9,3	151	160	150	61	42	50	57	48	32	31	41	40	73	36	39
20:0	596,598	10,7	61	73	55	83	75	67	51	41	32	48	49	55	58	48	45
22:0	624,627	11,9	212	276	221	196	188	135	247	246	301	203	215	274	208	176	168
24:0	652,661	13	870	1445	1251	2090	1254	1362	2202	1705	2204	1390	1730	1123	1372	1287	1177
24:1	650,645	12	203	273	275	677	466	238	713	748	744	646	889	691	645	572	495
Glucosil o galactosil Ceramidas																	
12:0	644,510	4,9	2360	2145	2266	2339	2469	2900	2604	2506	2943	2808	2643	2284	2844	2625	2301
14:0	672,542	5,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16:0	700,573	6,8	161	106	201	263	358	280	369	403	645	962	903	693	328	270	192
18:0	728,604	8,2	30	20	39	23	20	21	64	69	146	117	236	113	27	16	12
20:0	756,635	9,6	68	36	59	28	25	28	41	79	95	58	114	116	20	5	3
22:0	784,667	10,9	315	258	366	507	441	460	541	819	888	808	1018	489	594	237	212
22:1	782,651	10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
24:0	812,698	12,2	557	660	610	1954	1914	1835	1621	1491	1651	1808	1786	1124	2407	946	821
24:1	810,682	11,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
24:2	808,667	10,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lactosil Ceramidas																	
GluCer12:0	644,510	4,9	2360	2145	2266	2339	2469	2900	2604	2506	2943	2808	2643	2284	2844	2625	2301
14:0	834,594	5,45	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16:0	862,626	6,5	58	65	75	113	129	104	141	92	107	109	96	62	99	106	97
18:0	890,657	8	1	2	6	N.D.	N.D.	N.D.	2	1		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20:0	918,688	9,2	1	1	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	N.D.	1		1	1
22:0	946,720	10,7	2	1	1	1	1	1	3	1	2	1	1	N.D.	1	N.D.	N.D.
24:0	974,751	11,8	3	2	2	1	1	1	2	1,5	1	1	0,4	1	1	1	0,7
24:1	972,735	10,8	5	4	7	7	8	8	10	7	11	8	10	7	6	2	3
Esfingosina y similares																	
Sa-C17	288,290	1,7	148	130	120	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130
Sa-C17P	368,256	2	175	175	175	175	175	157	156	164	181	176	137	162	155	151	136
Sph	300,290	1,75	19	41	21	94	102	68	67	74	54	75	74	96	64	49	45
dhSph	302,306	1,90	30	59	47	134	120	108	98	94	79	123	109	132	72	54	62
S1P	380,257	2,10	87	60	70	142	152	101	124	116	139	177	197	218	159	88	85
	mL sangre		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Sup.Mat. 1.B. La tabla muestra en detalle las áreas de los picos de cada especie de esfingolípido analizada en sangre, su relación masa/carga (m/z), el tiempo de retención en el que se registra la elución del analito y la cantidad de muestra analizada (expresada en mL). Los datos marcados en gris corresponden a las medidas de los estándares internos o patrones ("spikes"). "R.T. (min)"= tiempo de retención en minutos. "N.D."= No detectada.

Suero																		
Muestras año 2012												Muestras año 2013						
Ácido graso	m/z	R.T. (min)	21 días			7 días		3 días	1 día	Control			7 días		3 días		1 día	
			WT_252	WT_253	WT_254	WT_255	WT_256	WT_259	WT_263	WT_264	WT_265	WT_266	#2	#7	#8	#11	#12	
Esfingomielinas																		
12:0	647,513	5,05	563	600	710	438	312	294	597	670	511	584	1553	246	189	299	248	
14:0	675,544	6	80	36	90	66	39	72	379	89	31	33	920	94	1	328	262	
14:1	673,528	5,2	7	3	8	4	3	7	24	8	3,0	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
16:0	703,575	7,26	6401	3001	7233	5762	4055	7408	14775	6446	2301	2213	12482	3054	2780	11212	9832	
16:1	701,560	6,3	625	325	778	561	175	395	1564	736	244	250	327	268	245	569	473	
18:0	731,607	8,73	621	258	709	516	188	532	3500	634	276	208	31649	276	283	3038	1801	
18:1	729,591	7,75	169	91	241	161	67	189	829	193	89	72	1134	37	34	104	95	
20:0	759,638	10,1	248	129	235	246	87	147	686	192	88	75	16598	93	96	420	375	
20:1	757,622	9,1	84	47	109	79	34	72	308	84	34	28	713	22	30	279	23	
22:0	787,669	11,4	1537	691	1575	1535	494	891	2524	1108	442	426	21550	316	343	2311	1738	
22:1	785,654	10,4	430	235	498	411	147	263	856	418	203	197	19073	55	51	301	55	
22:1	785,654	10,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	155	175	255	168	
22:2	783,638	9,4	61	30	82	60	24	54	177	62	24	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
24:0	815,701	12,6	2122	850	2278	1837	690	949	3556	1661	491	530	23723	135	91	2624	1852	
24:1	813,685	11,55	8839	4455	10025	7779	4924	8805	16119	7138	3388	3321	7925	103	100	12219	9457	
24:2	811,669	10,67	2248	1087	2782	2058	664	1862	4345	2348	814	809	6048	192	600	2692	2095	
24:3	809,654	9,90	142	74	184	138	57	96	296	175	58	55	780	65	48	190	166	
Dihidroesfingomielinas																		
SM12:0	647,513	5,05	563	600	710	438	312	294	597	670	511	584	7628	4152	2994	4015	3692	
14:0	677,560	6,45	0	0	1	0	0	0	31	1	0	0	328	32	31	220	157	
16:0	705,591	7,81	186	75	217	190	134	169	630	211	65,0	59	8092	1622	1450	8957	7875	
18:0	733,622	9,24	16	4	18	13	6	10	254	16	5	4	19331	138	137	5453	3407	
20:0	761,654	10,58	4	1	4	3	1	2	35	3	1	1	4116	42	40	452	319	
22:0	789,685	11,84	36	12	35	30	11	12	79	26	9	7	5809	232	122	1233	961	
24:0	817,716	12,99	31	12	34	26	9	9	64	27	9	9	3415	138	134	747	625	
24:1	815,701	11,98	190	78	252	146	53	77	875	153	62	64	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
Ceramidas																		
12:0	482,457	5,15	4844	5035	5496	4218	4900	4919	4122	5087	4498	4848	8973	4065	3035	3897	3682	
14:0	510,489	6,04	6	4	5	7	4	5	9	6	2	4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
14:1	508,473	5,13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
16:0	538,520	7,28	155	52	99	100	111	197	187	145	57	58	4429	137	124	167	157	
16:1	536,504	6,67	5	4	4	1	4	7	8	4	2	1	408	1	2	2	2	
18:0	566,551	8,74	42	14	34	37	29	54	87	43	20	18	9630	47	34	99	70	
18:1	564,536	8,00	8	2	5	5	5	10	12	6	3	2	2099	2	2	4	4	
20:0	594,583	10,3	38	19	33	44	44	45	64	31	15	14	964	43	40	59	53	
20:1	592,567	9,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
22:0	622,614	11,60	274	141	259	345	325	280	300	232	113	121	800	458	445	395	439	
22:1	620,598	10,50	9	4	11	10	10	8	16	7	5	7	806	13	10	18	16	
22:1	620,598	10,70	17	8	16	21	17	19	15	13	5	7	100	22	18	6	6	
24:0	650,645	12,7	2089	717	2224	2400	1977	1688	3330	1673	462	593	3017	1114	1035	1953	1951	
24:1	648,630	11,7	1453	428	1666	1602	1464	1087	1786	994	412	547	5259	1104	924	1462	1394	
24:1	648,630	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	756	79	70	1462	1394	
24:2	646,614	11	99	38	119	114	97	99	108	71	36	35	955	103	79	83	89	
Dihidrocera midas																		
Cer12:0	482,457	5,15	4844	5035	5496	4218	4900	4919	4122	5087	4498	4848	8973	4065	3035	3897	3682	
14:0	512,504	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
16:0	540,536	8	28	12	25	31	24	55	64	52	17	18	116	42	36	63	67	
18:0	568,567	9,3	5	2	4	5	4	6	28	8	1	3	185	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
20:0	596,598	10,7	4	2	3	7	4	3	13	3	1	1	99	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
22:0	624,627	11,9	44	28	46	57	53	78	98	84	28	37	139	67	56	108	106	
24:0	652,661	13	91	47	112	129	113	158	297	187	58	71	83	79	66	160	162	
24:1	650,645	12	55	24	61	56	52	68	230	81	30	34	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
Glucosil o galactosil Ceramidas																		
12:0	644,510	4,9	2270	2860	3079	2303	3138	2519	2487	2746	2483	2825	1913	2704	2144	2439	2445	
14:0	672,542	5,8	7	2	6	6	6	6	32	5	N.D.	3	483	27	24	88	112	
16:0	700,573	6,8	331	150	466	365	455	637	1029	293	114	122	4069	456	431	1574	2092	
18:0	728,604	8,2	54	24	78	65	54	165	284	60	27	24	32769	127	138	809	943	
20:0	756,635	9,6	63	38	90	84	90	157	173	55	25	27	12670	144	147	360	396	
22:0	784,667	10,9	464	249	655	654	601	1145	941	455	156	176	11833	1059	1073	1466	1896	
22:1	782,651	10	27	21	164	23	39	62	118	30	12	10	19908	37	35	167	201	
24:0	812,698	12,2	635	273	1039	909	735	1369	1333	630	182	151	26416	809	787	1375	1749	
24:1	810,682	11,1	1151	442	1887	1364	1480	2399	2323	1245	312	417	42358	1341	1263	2225	2546	
24:2	808,667	10,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5734	204	204	455	493	
Lactosil Ceramidas																		
GluCer12:0	644,510	4,9	2270	2860	3079	2303	3138	2519	2487	2746	2483	2825	1913	2704	2144	2439	2445	
14:0	834,594	5,45	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
16:0	862,626	6,5	15	6	17	14	9	28	13	12	0,5	N.D.	202	21	23	52	18	
18:0	890,657	8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	293	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
20:0	918,688	9,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	51	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
22:0	946,720	10,7	2	N.D.	1	1	1	2	1	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
24:0	974,751	11,8	5	2	4	5	3	6	1	4	0,2	N.D.	8	5	4	11	5	
24:1	972,735	10,8	8	3	11	8	6	15	5	6	1	1	60	6	8	20	9	
Esfingosina y similares																		
Sa-C17	288,290	1,7	359	312	365	263	370	300	300	302	276	324	325	249	196	237	247	
Sa-C17P	368,256	2	97	88	180	60	92	60	79	58	65	61	154	88	118	113	122	
Sph	300,290	1,75	35	39	64	56	24	32	35	36	36	41	700	6	6	8	6	
dhSph	302,306	1,90	5	2	8	7	8	5	6	4	2	2	216	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
S1P	380,257	2,10	123	59	92	113	94	86	109	71	51	53	101	72	85	117	158	
	ml suero		0,10	0,05	0,10	0,10	0,12	0,13	0,09	0,09	0,05	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	



Sup.Mat. 2 (página presente y la siguiente). La figura muestra las gráficas individuales de los datos correspondientes a los “Spikes” en función del tipo de muestra y según el test “Box Plot”. Las gráficas para SM12:0 y dhSM12:0 de sangre son idénticas ya que no se realizó un segundo análisis de estas muestras. Los valores obtenidos para el “Spike” correspondiente a la especie esfingosina en muestras de sangre no fue detectado en muchas de las muestras, por lo que la gráfica podría no ajustarse fielmente a los datos obtenidos.



Tejido	Año	Familia	Valor	Q _{calculada}	Probabilidad	Outlier	Individuo
Médula espinal	2012	Cer	9417	0.24043	0.8332	No	-
	2013		3914	0.76543	0.02478	Sí	#2
			7089	0.56012	0.3997	No	-
	2012	SM	1154	0.35211	0.6041	No	-
	2013		1172	0.04615	0.1414	No	-
	2013	dhSM	3276	0.77645	0.0211	Sí	#2
			7114	0.32398	0.9999	No	-
	2012	GluCer	3969	0.47644	0.19	No	-
	2013		3163	0.57852	0.1702	No	-
	2012	Sph	195	0.49635	0.1487	No	-
	2013		89	0.88725	< 2.2e-16	Sí	#2
	2013		270	0.6087	0.3092	No	-
	2012	S1P	101	0.6625	0.005	Sí	WT_260
			151	0.2	0.5602	No	-
	2013		63	0.78049	0.01985	Sí	#2
			186	0.66667	0.2174	No	-
Sangre	2012	Cer	3489	0.59186	0.03042	Sí	WT_263
			5378	0.028758	< 2.2e-16*	Sí	WT_260
			5367	0.09832	0.1803	No	-
		SM	134	0.45571	0.2388	No	-
		GluCer	2943	0.15023	0.3727	No	-
		Sph	148	Datos no concluyentes			
		S1P	136	Datos no concluyentes			
Suero	2012	Cer	5496	0.32003	0.4147	No	-
	2013		8973	0.82654	0.008649	Sí	#2
			3035	0.62816	0.2764	No	-
	2012	SM	294	0.04787	0.3095	No	-
	2013		1553	0.91935	2.2e-16	Sí	#2
			189	0.51818	0.4893	No	-
	2013	dhSM	7628	0.75011	0.03058	Sí	#2
			2994	0.60276	0.3195	No	-
	2012	GluCer	3138	0.07066	0.4446	No	-
	2013		1913	0.29204	0.8533	No	-
	2012	Sph	263	0.12745	0.7644	No	-
	2013		325	0.58915	0.1566	No	-
	2012	S1P	180	0.69167	< 2.2e-16	Sí	WT_254
			97	0.13514	0.7384	No	-
			2013	154	0.48485	0.3271	No

Sup.Mat. 3. Identificación de valores anómalos mediante el test de Dixon. En la tabla se muestran los resultados del test de Dixon sobre los valores extremos de los “spikes”. En cada caso se indica el tejido muestreado, el año de muestreo, la familia asociada al spike, el valor extremo en dicha serie, el factor Q_{calculada} correspondiente, la probabilidad de su pertenencia a la misma distribución del resto de datos y el individuo de origen. *El valor del “spike” para ceramidas del individuo WT_260 fue considerado anómalo en los análisis iniciales, con una $P < 2.2 \times 10^{-16}$ según el cálculo realizado con la librería “Outliers” del software R. Sin embargo, este resultado resulta extraño ya que el siguiente valor más cercano es 5367 y el valor mínimo de la serie 4572. De hecho, al compararlo manualmente con la tabla del factor Q_{teórico} de Dixon la probabilidad asociada es $P > 0.05$, por lo que consideramos que se trata de un error en la ejecución del software, quedando excluido de los valores anómalos.

Médula espinal															
	Control			1dpo			3dpo			7dpo			21dpo		
Especie	WT_264	WT_265	WT_266	WT_261	WT_262	WT_263	WT_258	WT_259	WT_260	WT_255	WT_256	WT_257	WT_252	WT_253	WT_254
SM 14:0	3,31	4,63	2,17	1,72	2,08	2,85	4,08	3,06	5,1	4,46	5,75	3,43	4,09	4,13	2,72
SM 14:1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02	0,04	0,03	0,03	0,02	0,04	0,03	0,02
SM 16:0	29,97	49,07	24,05	38,63	39,97	36,58	72,21	75,24	156,41	71,04	81,13	58,79	122,74	102,42	84,66
SM 16:1	0,6	0,92	0,42	0,83	0,84	0,7	1,68	1,75	3,17	1,22	1,26	0,99	2,44	2,01	1,46
SM 18:0	214,6	366,84	152,8	177,63	206,2	210,06	227,54	223,42	502,26	392,26	341,13	277,51	340,52	441,65	255,9
SM 18:1	10,18	14,56	4,91	3,54	5,67	6,83	9,58	7,28	12,83	11,1	8,24	12,07	10,97	11,9	8,46
SM 20:0	66,39	109,13	47,64	60,56	69,72	70,75	58,93	67,91	157,74	119,78	97,41	83,57	109,18	135,15	73,27
SM 20:1	3,34	4,65	1,98	2,12	2,77	2,96	2,98	2,76	5,68	4,09	4,15	3,4	3,92	4,57	2,64
SM 22:0	65,68	101,95	41,63	61,53	78,45	72,67	61,35	66,21	180,43	135,79	81,7	75,06	125,46	134,29	71,25
SM 22:1	76,35	109,34	47,05	60,54	75,13	72,25	65,59	67,2	153,68	121,04	107,23	82,15	104,68	131,66	68,29
SM 22:1	1,19	1,52	0,64	0,69	0,96	1,05	1,09	1	1,99	1,47	1,74	1,27	1,27	1,48	0,88
SM 24:0	114,29	194,47	83,59	106,08	129,58	127,76	130,64	133,81	292,23	192,82	183,16	125,78	217,01	247,64	123,87
SM 24:1	252,25	365,11	155,45	221,8	274,23	243,05	230,73	234,02	622,81	486,14	339,06	298,32	426,63	504,99	259,31
SM 24:2	13,18	17,68	6,69	10,61	12,69	13,46	16,84	15,2	33,47	24,14	19,24	17,4	23,28	14,21	9,41
SM 24:3	0,38	0,64	0,24	0,35	0,39	0,4	0,45	0,51	0,91	0,64	0,67	0,56	0,87	0,85	0,45
SM Total	851,73	1340,53	569,28	746,65	898,69	861,38	883,72	899,39	2128,75	1566,02	1271,9	1040,32	1493,1	1736,98	962,59
%	51,14	53,01	51,88	53,51	52,64	55,77	48,61	51,34	60,59	56,47	49,42	51,77	58,23	60,04	55,49
dhSM 14:0	0,08	0,14	0,05	0,05	0,1	0,08	0,12	0,11	0,18	0,09	0,19	0,11	0,14	0,17	0,1
dhSM 16:0	1,38	1,84	1,03	2,03	2,08	1,9	5,23	5,66	7,63	3,28	3,95	2,76	5,87	3,64	3,49
dhSM 18:0	23,77	38,62	18,56	20,49	23,09	28,03	29,83	30,68	58,14	44,11	44,43	35,7	37,67	44,3	27,11
dhSM 20:0	3,62	6,92	2,18	3,04	3,82	5,92	5,51	5,53	9,5	5,75	5,65	5,78	6,02	4,2	2,53
dhSM 22:0	21,38	35,5	12,96	18,29	24,66	23,95	21,25	22,16	51,75	39,66	27,47	26,31	36,67	29,29	17,06
dhSM 24:0	15,36	26,07	12,93	13,85	17,43	18,88	20,33	20,41	35,06	18,86	31,25	18,17	32,77	31,84	16,17
dhSM 24:1	44,37	61,58	25,81	34,76	41,57	43,15	49,65	41,83	89,78	66,09	59,65	57,51	60,66	57,59	29,43
dhSM Total	109,96	170,67	73,52	92,51	112,75	121,91	131,92	126,38	252,04	177,84	172,59	146,34	179,8	171,03	95,89
%	6,60	6,75	6,70	6,63	6,60	7,89	7,26	7,21	7,17	6,41	6,71	7,28	7,01	5,91	5,53
Cer 14:0	0,11	0,08	0,11	0,22	0,18	0,19	0,21	0,28	0,39	0,17	0,27	0,14	0,25	0,26	0,2
Cer 16:0	1,79	0,75	2,62	8,35	5,33	6,08	7,52	12,7	22,01	7,29	11,6	5,82	11,59	13	9,09
Cer 16:1	0,15	0,07	0,17	0,46	0,34	0,38	0,76	1,17	1,99	0,44	0,6	0,39	0,74	0,72	0,48
Cer 18:0	18,24	17,81	15,82	27,86	30,38	23,4	21,92	29,2	53,19	31,22	34	22,22	29,78	38,7	27,07
Cer 18:1	4,54	2,12	3,19	4,41	1,54	3,54	4,44	5,47	8,9	5,05	4,6	4,49	3,92	5,81	4,88
Cer 20:0	0,66	0,95	0,52	1,38	1,71	0,97	0,96	1,07	2,79	1,55	1,04	0,78	1,43	1,67	1,03
Cer 22:0	0,41	0,59	0,32	0,55	0,99	0,62	0,46	0,5	1,03	0,87	0,55	0,34	0,83	0,9	0,56
Cer 22:1	0,41	0,4	0,31	0,44	0,61	0,49	0,55	0,57	1,01	0,64	0,51	0,31	0,58	0,61	0,4
Cer 22:1	0,03	0,05	0,04	0,05	0,08	0,07	0,07	0,08	0,15	0,12	0,08	0,08	0,06	0,09	0,11
Cer 24:0	3,07	3,87	2,62	4,01	6,01	4,78	3,91	4,63	7,83	7,09	4,74	2,69	8,17	8,47	5
Cer 24:1	4,37	4,41	3,63	5,16	6,47	5,33	5,32	6,44	10,08	7,81	6,5	4,25	6,78	9,23	6,53
Cer 24:2	0,19	0,15	0,18	0,37	0,34	0,27	0,34	0,47	1,01	0,55	0,46	0,36	0,53	0,77	0,41
Cer Total	33,97	31,25	29,53	53,26	53,98	46,12	46,46	62,58	110,38	62,8	64,95	41,87	64,66	80,23	55,76
%	2,04	1,24	2,69	3,82	3,16	2,99	2,56	3,57	3,14	2,26	2,52	2,08	2,52	2,77	3,21
dhCer 16:0	0,04	0,04	0,06	0,16	0,19	0,12	0,23	0,27	0,39	0,18	0,25	0,12	0,35	0,24	0,19
dhCer 18:0	0,19	0,23	0,15	0,34	0,59	0,31	0,42	0,38	0,8	0,59	0,29	0,2	0,38	0,37	0,29
dhCer 20:0	0,03	0,03	0,02	0,04	0,08	0,04	0,05	0,03	0,03	0,08	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02
dhCer 22:0	0,1	0,14	0,07	0,11	0,26	0,15	0,13	0,14	0,3	0,24	0,1	0,07	0,11	0,08	0,06
dhCer 24:0	0,16	0,23	0,12	0,27	0,46	0,31	0,26	0,28	0,79	0,5	0,23	0,13	0,47	0,41	0,23
dhCer 24:1	0,27	0,33	0,21	0,27	0,53	0,35	0,34	0,39	0,63	0,35	0,33	0,24	0,35	0,34	0,27
dhCer Total	0,79	1	0,63	1,19	2,11	1,28	1,43	1,49	2,94	1,94	1,23	0,78	1,69	1,46	1,06
%	0,05	0,04	0,06	0,09	0,12	0,08	0,08	0,09	0,08	0,07	0,05	0,04	0,07	0,05	0,06
GluCer 14:0	0,5	0,79	0,3	0,45	0,55	0,4	0,5	0,41	0,6	0,5	0,76	0,43	0,37	0,39	0,28
GluCer 16:0	11,65	15,59	7,75	6,33	7,7	8,95	13,99	14,43	16,14	10,79	20,27	10,87	11,82	9,06	8,7
GluCer 18:0	150,29	230,53	100,22	114,58	136,83	117	167,24	144,85	231,5	198,44	242,89	171,07	184,32	194,2	136,41
GluCer 20:0	52,03	71,15	32,83	39,52	51,92	39,95	58,48	48,4	71,8	79,19	77,17	58,33	61,98	69,84	46,89
GluCer 22:0	41,44	57,07	23,9	32,78	45,97	32,68	47,99	37,13	66,85	70,83	59,29	47,73	53,03	59,75	38,65
GluCer 22:1	78,35	106,42	47,93	52,29	69,42	55,58	72,09	67,3	95,17	89,96	116,32	78,1	78,26	85,32	58,29
GluCer 24:0	134,27	206,4	82,46	109,21	135,63	109,89	154,33	135,13	217,5	202,79	211,09	148,81	175,02	187,13	114,09
GluCer 24:1	164,7	245,83	105,56	122,66	160,24	123,43	179,79	167,41	253,79	235,33	267,51	194,6	195,01	219,07	142,71
GluCer 24:2	19,73	26,45	11,52	12,74	15,84	12,81	22,13	18,5	28,56	26,53	18,14	22,59	19,68	23,55	15,18
GluCer Total	652,96	960,23	412,47	490,56	624,1	500,69	716,54	633,56	981,91	914,36	1013,44	732,53	779,49	848,31	561,2
%	39,20	37,97	37,59	35,16	36,55	32,41	39,41	36,16	27,95	32,97	39,38	36,46	30,40	29,32	32,35
LacCer 16:0	0,41	0,56	0,29	0,25	0,28	0,33	0,77	0,9	0,89	0,55	0,83	0,6	0,91	0,55	0,58
LacCer 18:0	1,37	1,85	0,85	0,94	0,92	0,85	1,57	1,27	1,88	1,95	2,07	1,45	1,18	1,38	0,88
LacCer 20:0	0,2	0,27	0,12	0,16	0,17	0,14	0,34	0,22	0,34	0,46	0,3	0,24	0,3	0,3	0,2
LacCer 22:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0,02	0,06	0,04	0,01	0,01	0,01	0,02
LacCer 24:0	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,08	0,04	0,05	0,12	0,05	0,03	0,04	0,03	0,04
LacCer 24:1	0,15	0,19	0,08	0,09	0,14	0,09	0,24	0,17	0,21</						

	Sangre													
	Ctrl			1dpo		3dpo			7dpo			21dpo		
Especie	WT_264	WT_265	WT_266	WT_261	WT_262	WT_258	WT_259	WT_260	WT_255	WT_256	WT_257	WT_252	WT_253	WT_254
SM 14:0	535,76	592,78	700,3	1610,11	1667,97	573,14	565,66	629,48	534,88	512,24	379,15	364,72	507,73	429,72
SM 14:1	41,21	47,32	50,45	120,34	96,73	35,97	45,45	37,18	42,64	24,49	26,07	26,91	35,32	32,13
SM 16:0	35486,06	41023,66	42878,34	49689,53	58397,39	48148,68	74828,28	48031,87	60755,81	35771,43	30272,51	33710,01	40913,91	47622,49
SM 16:1	3246,06	3539,23	3335,31	5013,24	5932,03	3832,13	2131,31	3952,19	2065,89	2279,59	2270,14	2032,88	2662,25	1670,68
SM 18:0	8244,85	8555,42	9154,3	12409,15	14321,57	11462,83	11858,59	11750,33	12267,44	7014,29	7078,2	8254,11	10326,71	7012,05
SM 18:1	695,76	764,63	735,91	1494,58	1728,1	1026,38	1207,07	1134,13	922,48	440,82	481,04	648,73	883	767,07
SM 20:0	5372,12	6017,43	6154,3	5663,06	6980,39	5767,39	5065,66	6167,33	6348,84	5336,73	4417,06	4618,83	6158,94	3983,94
SM 20:1	346,67	363,64	388,72	500,6	729,41	479,62	560,61	515,27	589,15	289,8	289,1	493,27	635,76	485,94
SM 22:0	23966,06	26764,63	28872,4	24630,57	27218,3	26043,17	38085,86	26589,64	36480,62	22122,45	20049,76	21402,09	24494,48	28485,94
SM 22:1	5917,58	6871,73	6890,21	6284	7892,81	6429,26	4989,9	5822,05	6720,93	4634,69	4627,96	3581,46	4878,59	3433,73
SM 22:2	349,09	328,77	400,59	394,71	611,76	513,19	762,63	592,3	713,18	418,37	374,41	457,4	622,52	445,78
SM 24:0	45246,06	50044,83	54824,93	48916,97	52130,72	45702,64	72959,6	47320,05	71976,74	41491,84	35831,75	38535,13	45412,8	62301,2
SM 24:1	38230,3	43459,53	45035,61	49790,61	57597,39	38515,59	55898,99	41144,75	61116,28	33195,92	30810,43	29279,52	35028,7	46389,56
SM 24:2	25767,27	28191,78	29270,03	27511,43	30013,07	24920,86	29005,05	25176,63	32573,64	24212,24	19992,89	13739,91	18679,91	19172,69
SM 24:3	1306,67	1307,6	1379,82	1290,01	1589,54	1290,17	1237,37	1381,14	1484,5	1140,82	1000	905,83	1386,31	839,36
SM Total	194751,52	217872,98	230071,22	235318,91	266907,18	214741,02	299202,03	220244,34	294593,02	178885,72	157900,47	158050,8	192626,93	223072,28
%	91,32	93,00	93,20	89,92	91,01	91,39	93,05	91,75	92,53	90,33	91,97	93,24	92,89	94,59
dhSM 14:0	7,27	9,96	8,9	67,39	104,58	19,18	5,05	18,59	3,88	16,33	7,11	11,96	4,42	12,05
dhSM 16:0	1595,15	1638,85	1884,27	1737,67	3294,12	2364,51	2843,43	2236,39	3050,39	1557,14	1016,59	1805,68	2609,27	1297,19
dhSM 18:0	458,18	503,11	569,73	604,09	807,84	640,29	1252,53	695,88	1166,67	624,49	469,19	585,95	719,65	582,33
dhSM 20:0	256,97	266,5	296,74	255,11	324,18	309,35	272,73	302,79	325,58	344,9	156,4	203,29	384,11	176,71
dhSM 22:0	1153,94	1554,17	1234,42	1143,2	1403,92	1592,33	2000	1495,35	2073,64	1873,47	1037,91	681,61	1302,43	907,63
dhSM 24:0	785,45	889,17	842,73	7429,6	1014,38	1076,74	722,22	924,3	879,84	1044,9	639,81	863,98	1041,94	871,49
dhSM 24:1	4659,39	5041,1	5255,19	5198,56	7783,01	4546,76	6257,58	4778,22	7232,56	4142,86	2891	2161,43	2790,29	3590,36
dhSM Total	8916,35	9902,86	10091,98	16435,62	14732,03	10549,16	13353,54	10451,52	14732,56	9604,09	6218,01	6313,9	8852,11	7437,76
%	4,18	4,23	4,09	6,28	5,02	4,49	4,15	4,35	4,63	4,85	3,62	3,72	4,27	3,15
Cer 14:0	2,98	3,4	2,79	5,54	4,66	2,9	1,94	2,23	2,61	3,03	2,24	1,3	2,19	1,23
Cer 16:0	151,29	132,68	132,96	211,62	264,97	180,43	167,76	264,78	166,74	207,96	117,25	120,53	122,92	146,31
Cer 16:1	5,22	5,67	8,76	7,66	10,58	4,97	3,87	5,21	13,5	11,67	1,49	3,47	3,94	4,1
Cer 18:0	66,33	24,57	27,07	43,86	52,06	69,52	72,45	72,15	63,56	45,83	47,42	61,57	72,18	68,44
Cer 18:1	1,12	0,38	0,4	0,85	1,69	1,66	1,55	1,49	1,31	0,86	0,75	3,03	4,81	3,69
Cer 20:0	84,96	41,2	44,59	51,95	61,8	67,87	56,95	60,62	106,66	100,3	82,15	57,23	74,8	64,75
Cer 22:0	451,65	261,95	300,96	356,82	377,57	474,24	463,39	423,58	579,89	568,53	421,21	408,84	440,07	361,07
Cer 22:1	23,48	9,07	10,75	15,75	11,85	14,07	11,24	10,04	18,72	16,86	16,8	11,27	11,81	11,89
Cer 22:1	20,87	16,25	17,91	14,48	17,35	19,86	16,66	14,13	24,81	20,32	18,67	19,51	16,62	19,67
Cer 24:0	2525,81	2077,11	2171,18	2409,2	2497,78	2822,68	2361,49	2359,61	3194,17	2644,19	2192,31	2140,47	2404,64	1953,28
Cer 24:1	719,21	640,71	662,82	882,27	874,92	792,05	791,94	800,3	883,33	810,64	666,54	522,87	569,12	548,36
Cer 24:2	154,28	98,66	108,68	164,79	173,12	125,39	153,04	149,5	154,55	135,32	120,61	83,24	84,86	99,59
Cer Total	4207,2	3311,65	3488,87	4164,79	4348,35	4575,64	4102,28	4163,64	5209,85	4565,51	3687,44	3433,33	3807,96	3282,38
%	1,97	1,41	1,41	1,59	1,48	1,95	1,28	1,73	1,64	2,31	2,15	2,03	1,84	1,39
dhCer 16:0	15,28	11,34	15,13	12,77	19,05	23,17	18,98	17,11	23,07	20,32	13,82	45,52	44,18	45,08
dhCer 18:0	27,2	13,61	15,53	13,2	17,35	23,59	18,6	11,9	26,56	18,16	18,67	65,47	69,99	61,48
dhCer 20:0	21,61	18,14	17,91	20,44	20,74	21,1	15,89	11,9	36,13	32,43	25,02	26,45	31,93	22,54
dhCer 22:0	77,51	66,53	66,88	86,44	91,01	102,21	95,31	111,94	85,33	81,28	50,41	91,91	120,73	90,57
dhCer 24:0	511,27	486,49	468,55	591,87	732,28	911,24	660,6	819,64	909,88	542,15	508,59	377,19	632,11	512,7
dhCer 24:1	240,36	216,22	197,05	275,07	376,3	295,05	289,81	276,68	294,73	201,47	88,87	88,01	119,42	112,7
dhCer Total	893,23	812,33	781,05	999,79	1256,73	1376,36	1099,19	1249,17	1375,7	895,81	705,38	694,55	1018,36	845,07
%	0,42	0,35	0,32	0,38	0,43	0,59	0,34	0,52	0,43	0,45	0,41	0,41	0,49	0,36
GluCer 16:0	230,66	205,71	166,88	685,19	683,31	283,41	321,63	438,33	224,88	290	193,1	136,44	98,83	177,41
GluCer 18:0	18,99	12,19	10,43	83,33	178,58	49,16	55,07	99,22	19,67	16,2	14,48	25,42	18,65	34,42
GluCer 20:0	14,06	3,81	2,61	41,31	86,27	31,49	63,05	64,56	23,94	20,25	19,31	57,63	33,57	52,07
GluCer 22:0	417,72	180,57	184,27	575,5	770,34	415,51	653,63	603,47	433,52	357,23	317,24	266,95	240,56	323,04
GluCer 24:0	1692,69	720,76	713,6	1287,75	1351,49	1245,01	1189,94	1121,98	1670,8	1550,43	1265,52	472,03	615,38	538,39
GluCer Total	2374,12	1123,04	1077,79	2673,08	3069,99	2024,58	2283,32	2327,56	2372,81	2234,11	1809,65	958,47	1006,99	1125,33
%	1,11	0,48	0,44	1,02	1,05	0,86	0,71	0,97	0,75	1,13	1,05	0,57	0,49	0,48
LacCer 16:0	69,62	80,76	84,31	77,64	72,64	108,29	73,42	72,71	96,62	104,5	71,72	49,15	60,61	66,2
LacCer 24:0	0,7	0,76	0,61	0,71	0,3	1,54	1,2	0,68	0,86	0,81	0,69	2,54	1,86	1,77
LacCer 24:1	4,22	1,52	2,61	5,7	7,57	7,68	5,59	7,48	5,99	6,48	5,52	4,24	3,73	6,18
LacCer Total	74,54	83,04	87,53	84,05	80,51	117,51	80,21	80,87	103,47	111,79	77,93	55,93	66,2	74,15
%	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,05	0,02	0,03	0,03	0,06	0,05	0,03	0,03	0,03
S1P	2051,61	1165,56	1250	2011,36	2875,91	1589,74	1414,63	1535,91	F.S.	1737,14	1286,62	F.S.	F.S.	F.S.
%	0,96	0,50	0,51	0,77	0,98	0,68	0,44	0,64	-	0,88	0,75	-	-	-
Suma Total	213268,57	234271,46	246848,44	261687,6	293270,7	234974,01	321535,2	240053,01	318387,41	198034,17	171685,5	169506,98	207378,55	235836,97

Mat. Sup. 4.B. La tabla muestra las concentraciones, expresadas en pmol/mL, de las distintas especies de esfingolípidos en sangre consideradas para futuros análisis. Los datos están normalizados con respecto al “spike” correspondiente y el volumen de muestra analizada. Los “totales” se refieren a la sumatoria de las concentraciones de las distintas especies de una misma familia. El porcentaje de cada familia está definido como la razón entre el total de la familia (Familia Total) con respecto al total de esfingolípidos analizados en la muestra (Suma Total). “F.S.”= fallo en “spike”; “dpo”= días post-operación.

Suero														
	Control			1dpo			3dpo			7dpo		21dpo		
	2012			2013			2012			2013		2012		2013
Especie	WT_264	WT_265	WT_266	WT_263	#11	#12	WT_259	#7	#8	WT_255	WT_256	WT_252	WT_253	WT_254
SM 14:0	295,19	242,66	226,03	1410,76	2195,26	2116,76	376,77	764,11	7,45	301,37	208,33	284,19	240	253,52
SM 16:0	21379,77	18011,74	15157,53	54997,21	75044,01	79416,04	38765,04	24788,95	29466,97	26310,5	21661,32	22738,9	20006,67	20374,65
SM 16:1	2441,13	1909,98	1712,33	5821,7	3810,41	3817,79	2066,98	2171,65	2597,41	2561,64	934,83	2220,25	2166,67	2191,55
SM 18:0	2102,82	2160,47	1424,66	13028,1	20336,36	14547,04	2783,88	2237,6	2997,28	2356,16	1004,27	2206,04	1720	1997,18
SM 18:1	640,13	696,67	493,15	3085,8	695,92	768,49	989,01	297,46	356,73	735,16	357,91	600,36	606,67	678,87
SM 20:0	636,82	688,85	513,7	2553,51	2813,36	3026,08	769,23	754,59	1019,86	1123,29	464,74	880,99	860	661,97
SM 20:1	278,61	266,14	191,78	1146,47	1864,33	189,69	376,77	181,38	320,79	360,73	181,62	298,4	313,33	307,04
SM 22:0	3674,96	3459,88	2917,81	9395,12	15470,56	14039,96	4662,48	2565,15	3635,89	7009,13	2638,89	5460,04	4606,67	4436,62
SM 22:1	1386,4	1589,04	1349,32	3186,3	2014,69	444,25	1376,24	443,97	544,34	1876,71	785,26	1527,53	1566,67	1402,82
SM 24:0	5509,12	3843,44	3630,14	13236,55	17562,91	14958,59	4965,99	1093,85	967,17	8388,13	3685,9	7538,19	5666,67	6416,9
SM 24:1	23674,96	26520,55	22746,58	60000	81787,35	76383,64	46075,35	837,09	1057,84	35520,55	26303,42	31399,64	29700	28239,44
SM 24:2	7787,73	6371,82	5541,1	16173,46	18015,7	16922,94	9743,59	1555,92	6363,2	9397,26	3547,01	7985,79	7246,67	7836,62
SM 24:3	580,43	454,01	376,71	1101,81	1269,86	1338,08	502,35	527,3	512,12	630,14	304,49	504,44	493,33	518,31
SM Total	70388,07	66215,25	56280,84	185136,79	242880,72	227969,35	113453,68	38219,02	49847,05	96570,77	62077,99	83644,76	75193,35	75315,49
%	90,17	90,70	88,90	91,82	92,55	91,79	93,17	83,96	85,69	89,99	91,45	91,34	91,52	91,72
dhSM 16:0	699,83	508,81	404,11	2345,06	4461,48	4265,89	884,35	781,33	968,33	867,58	715,81	660,75	500	611,27
dhSM 18:0	53,07	39,14	27,4	945,47	2716,41	1845,57	52,33	66,42	91,3	59,36	32,05	56,84	26,67	50,7
dhSM 20:0	9,95	7,83	6,85	130,28	225,39	172,99	10,47	20,19	26,72	13,7	5,34	14,21	6,67	11,27
dhSM 22:0	86,24	70,45	47,95	294,06	614,37	520,51	62,79	111,85	81,68	136,99	58,76	127,89	80	98,59
dhSM 24:0	89,55	70,45	61,64	238,23	372,31	338,71	47,1	66,43	89,64	118,72	48,08	110,12	80	95,77
dhSM Total	938,64	696,68	547,95	3953,1	8389,96	7143,67	1057,04	1046,22	1257,67	1196,35	860,04	969,81	693,34	867,6
%	1,20	0,95	0,87	1,96	3,20	2,88	0,87	2,30	2,16	1,11	1,27	1,06	0,84	1,06
Cer 16:0	62,78	50,69	47,85	102,41	85,53	85,37	62,09	67,2	81,57	47,42	36,54	64	42,68	36,03
Cer 16:1	1,73	1,78	0,83	4,38	1,14	1,28	2,21	0,63	1,17	0,47	1,32	2,06	3,28	1,46
Cer 18:0	18,62	17,79	14,85	47,64	50,87	37,78	17,02	22,98	22,2	17,54	9,55	17,34	11,49	12,37
Cer 18:1	2,6	2,67	1,65	6,57	1,91	2,43	3,15	1,21	1,3	2,37	1,65	3,3	1,64	1,82
Cer 20:0	13,42	13,34	11,55	35,05	30,1	28,72	14,18	20,91	26,5	20,86	14,48	15,69	15,59	12,01
Cer 22:0	100,45	100,49	99,83	164,29	202,81	238,63	88,25	225,26	293,21	163,58	106,98	113,13	115,72	94,25
Cer 22:1	3,03	4,45	5,78	8,76	9,48	8,91	2,52	6,39	6,6	4,74	3,29	3,72	3,28	4
Cer 22:1	5,63	4,45	5,78	8,21	3,25	3,41	5,99	10,61	11,6	9,96	5,6	7,02	6,57	5,82
Cer 24:0	724,4	410,85	489,27	1823,61	1002,35	1059,41	532,03	548,35	682,28	1137,98	650,76	862,51	588,44	809,32
Cer 24:1	430,4	366,39	368,81	978,07	750,29	756,85	342,61	543,02	608,98	759,6	481,9	599,92	351,26	606,26
Cer 24:2	30,74	32,01	28,88	59,14	42,47	48,26	31,21	50,78	51,97	54,05	31,93	40,88	31,19	43,3
Cer Total	1393,8	1004,91	1075,08	3238,13	2180,2	2271,05	1101,24	1497,34	1787,38	2218,57	1344	1729,57	1171,14	1626,64
%	1,79	1,38	1,70	1,61	0,83	0,91	0,90	3,29	3,07	2,07	1,98	1,89	1,43	1,98
dhCer 16:0	22,52	15,12	14,85	35,05	32,21	36,64	17,34	20,85	23,54	14,7	7,9	11,56	9,85	9,1
dhCer 22:0	36,37	24,9	30,53	53,67	55,24	57,36	24,58	33,02	36,58	27,03	17,45	18,17	22,98	16,74
dhCer 24:0	80,97	51,58	58,58	162,65	82,25	88,13	49,8	38,94	43,68	61,17	37,2	37,57	38,57	40,76
dhCer Total	139,86	91,6	103,96	251,37	169,7	182,13	91,72	92,81	103,8	102,9	62,55	67,3	71,4	66,6
%	0,18	0,13	0,16	0,12	0,06	0,07	0,08	0,20	0,18	0,10	0,09	0,07	0,09	0,08
GluCer 14:0	4,01	0	4,25	29,04	72,54	92,02	3,69	19,67	22,83	5,21	3,08	6,17	2,89	3,9
GluCer 16:0	235,02	183,65	172,74	933,98	1290,5	1711,82	392,06	336,92	402,36	316,98	233,87	291,63	216,73	302,7
GluCer 18:0	48,13	43,5	33,98	257,77	663,46	771,57	101,55	94,05	128,71	56,45	27,76	47,58	34,68	50,67
GluCer 20:0	44,12	40,27	38,23	157,02	295,15	324,16	96,63	106,5	137,21	72,95	46,26	55,51	54,9	58,46
GluCer 22:0	364,97	251,31	249,2	854,1	1202,18	1551,46	704,72	783,24	1000,73	567,95	308,91	408,81	359,76	425,46
GluCer 22:1	24,06	19,33	14,16	107,1	136,68	164,82	38,16	27,19	32,48	19,97	20,05	23,79	30,34	106,53
GluCer 24:0	505,34	293,19	213,81	1209,9	1127,2	1430,58	842,59	598,36	734,66	789,41	377,78	559,47	394,44	674,89
GluCer 24:1	998,65	502,62	590,44	2108,48	1824,62	2082,67	1476,53	991,5	1178,75	1184,54	760,71	1014,1	638,62	1225,72
GluCer Total	2224,3	1333,87	1316,81	5657,39	6612,33	8129,1	3655,93	2957,43	3637,73	3013,46	1778,42	2407,06	1732,36	2848,33
%	2,85	1,83	2,08	2,81	2,52	3,27	3,00	6,50	6,25	2,81	2,62	2,63	2,11	3,47
LacCer 16:0	9,71	0,81	N.D.	11,62	42,64	14,73	17,1	15,53	21,46	12,16	4,78	13,22	8,39	11,04
LacCer 24:0	3,24	0,32	N.D.	0,89	9,02	4,09	3,66	3,7	3,73	4,34	1,59	4,41	2,8	2,6
LacCer 24:1	4,86	1,61	1,42	4,47	16,4	7,36	9,16	4,44	7,46	6,95	3,19	7,05	4,2	7,15
LacCer Total	17,81	2,74	1,42	16,98	68,06	26,18	29,92	23,67	32,65	23,45	9,56	24,68	15,39	20,79
%	0,02	0,00	0,00	0,01	0,03	0,01	0,02	0,05	0,06	0,02	0,01	0,03	0,02	0,03
Sph	262,57	521,74	506,17	263,36	67,51	48,58	165,37	48,19	61,22	425,86	104,62	194,99	516,53	350,68
%	0,34	0,71	0,80	0,13	0,03	0,02	0,14	0,11	0,11	0,40	0,15	0,21	0,63	0,43
S1P	2696,34	3138,46	3475,41	3114,55	2070,8	2590,16	2222,22	1636,36	1440,68	3766,67	1647,97	2536,08	2770,47	1989,19
%	3,45	4,30	5,49	1,54	0,79	1,04	1,82	3,59	2,48	3,51	2,43	2,77	3,37	2,42
Suma Total	78061,39	73005,25	63307,64	201631,67	262439,28	248360,22	121777,12	45521,04	58168,18	107318,03	67885,15	91574,25	82163,98	82118,35

Mat. Sup. 4.C. La tabla muestra las concentraciones, expresadas en pmol/mL, de las distintas especies de esfingolípidos en suero consideradas para futuros análisis. Los datos están normalizados con respecto al “spike” correspondiente y el volumen de muestra analizada. Los “totales” se refieren a la sumatoria de las concentraciones de las distintas especies de una misma familia. El porcentaje de cada familia está definido como la razón entre el total de la familia (Familia Total) con respecto al total de esfingolípidos analizados en la muestra (Suma Total). “dpo”= días post-operación.

	Péptido	RT*	Carga	Fragmento	Análisis	Área del pico (UUA)											
						Control			1dpo			3dpo			7dpo		
						#400	#401	#406	#407	#411	#412	#416	#417	#418			
SPHK1	GLLPRPC[CAM]R	11,1	+2	b3	1	17599	12012	18672	12439	15469	25784	18370	19829	26311			
					2	12447	17546	9317	11795	16168	28132	24262	26116	15863			
					3	10827	24744	11417	10308	21800	22265	21641	33666	17611			
				y5	1	39072	63703	38691	40353	43749	52599	63907	85218	101670			
					2	49983	64587	41958	47726	54337	52941	77482	85409	104180			
					3	65962	65955	44455	49468	54838	50509	77016	90925	108240			
	MEPVEC[CAM]PR	11,3	+2	b6	1	8206	18314	9019	11425	13099	20721	21926	21426	26710			
					2	12156	20274	7974	14166	15671	11818	27306	25797	26901			
					3	13180	19514	12533	10591	15205	14068	27240	29351	22108			
				y3	1	4580	6457	15226	9805	21378	19331	9291	7094	9122			
					2	5024	13642	27223	11166	28342	5262	12686	7066	4782			
					3	4907	5082	20446	14401	25173	19662	5675	10376	3864			
SPHK2	LSYLPATTEPALPIGHSLPR	7	+3	y15(2+)	1	3867	5642	70506	46450	79907	70488	20136	14769	22158			
					2	10256	13461	76532	59074	93886	25163	25239	17811	27615			
					3	10379	9521	90656	64747	96237	29493	32790	24405	28133			
				y16(2+)	1	405	1747	27359	14757	28928	23525	6348	4614	6112			
					2	1879	4528	33661	23702	34723	7896	11520	5611	7507			
					3	440	2953	34258	21266	34284	10136	4904	7288	9999			
	GVPLSGDQIEITPELLPR	7,93	+2	y5	1	7898	2421	2124	1115	1716	1976	2026	1010	1924			
					2	934	3596	2557	2138	1834	1713	2445	1507	1146			
					3	2217	2266	2271	1574	3296	1745	3177	3694	1169			
				y6	1	24235	7574	8449	9518	7153	11259	6793	6807	6928			
					2	8142	15821	7474	8184	5659	7697	10286	7588	7162			
					3	6632	8843	7484	6953	9087	6615	10349	8912	5798			
SPPI1	ITIPILAC[CAM]K	7,53	+2	b3	1	3682	1154	1381	646	748	885	1099	1390	641			
					2	1069	2091	855	962	753	748	1176	428	1103			
					3	1710	1206	641	432	1710	659	1181	671	428			
				y2	1	40685	27256	28900	29888	19612	3302	30782	35597	35284			
					2	37532	31040	26188	24973	21825	4411	33016	33877	30470			
					3	30608	33382	26055	28188	19339	4623	33233	34489	31284			
	NSLTGEEGELVK	11,9	+2	y2	1	23583	16656	15397	13407	9975	6098	19084	28517	20534			
					2	21153	19930	10402	13498	14835	7828	20933	20333	18109			
					3	20999	20524	8032	13501	11764	1102	20675	21591	21353			
				y6	1	37551	19366	8652	15502	10071	42565	43429	33513	28397			
					2	27320	32854	6677	10228	6210	56398	40433	30112	29751			
					3	28037	32256	7959	11399	8552	49596	34551	33287	27997			
SPPI2	WPRPSFPVVR	7,13	+3	b5	1	51266	41283	24390	25972	26489	60763	24599	33261	27710			
					2	31964	58379	27239	30271	28292	21270	26222	30054	26579			
					3	31944	33068	26682	30153	33549	24938	28663	27586	28728			
				y5	1	11849	14089	18523	12537	13835	11495	8960	7932	7502			
					2	22227	10092	14663	9702	9406	7896	11032	6384	6896			
					3	30226	18947	3847	22382	8264	6007	21163	6061	6868			
	AGYPLEKPFDFR	8,06	+2	b6	1	13289	9773	7509	6202	8604	10340	4896	8432	7808			
					2	9568	13233	7864	7744	8321	6409	7872	5184	8374			
					3	7481	12284	5291	9102	7224	5826	9477	6818	5205			
				y2	1	8456	9240	33742	29844	41131	20853	11394	11801	14264			
					2	4966	10559	34561	31705	42781	34414	16873	4580	8456			
					3	11615	7502	34033	37895	61132	28162	17639	12514	11707			
SPL	TLPAQMGTAIEVLER	8,7	+2	y3	1	8118	8311	49759	26994	59477	20426	5744	7494	13744			
					2	10343	7799	51778	24592	67087	38442	23022	15351	4771			
					3	13202	15460	57133	29444	64039	40321	8952	15547	19888			
				y5	1	8546	4268	55694	28036	61130	24952	12785	10178	2908			
					2	9351	12060	61029	39927	63118	48779	16992	9335	8661			
					3	6891	3129	55742	31511	70921	47373	22386	13246	5113			
	AGYPLEKPFDFR[+10]	9,61	+2	y3	1	263310	75287	76967	83637	39971	79327	82437	44303	29814			
					2	39373	147230	84112	89376	79380	25083	77487	39150	29126			
					3	49278	113210	84357	90251	85230	21573	31246	35279	19810			
				y6	1	300250	112810	64719	83588	77855	124790	68292	72045	50902			
					2	81030	232640	71587	83116	80313	57731	62561	60897	45236			
					3	56413	91577	79054	82679	79313	57276	55779	53689	37332			
SPL (AQUA™)	AGYPLEKPFDFR[+10]	9,61	+2	y7	1	310890	120450	74829	90966	71185	130710	61808	68649	50111			
					2	92421	233160	75382	91682	80800	55326	63339	66225	45483			
					3	70048	90812	73210	83070	85177	57921	51402	57011	39976			
				y3	1	13926	8341	54342	43414	29782	42444	21971	17612	19639			
					2	11357	7161	44237	34689	23943	44849	19010	17109	16396			
					3	10427	11192	46763	34750	28999	43473	16849	11385	11828			
	YITMLK	7,98	+2	y4	1	77807	32809	309360	260400	191880	255760	103760	76111	104410			
					2	45526	45381	251600	217400	148570	254590	84169	63022	80667			
					3	43448	44806	246150	225230	140240	241700	76457	70717	79499			
				y5	1	3278	2826	9570	11142	9917	8044	6153	4455	4304			
					2	5077	5406	9675	10091	7465	7017	5841	6826	6335			
					3	970	4046	9700	11472	4089	7784	4271	8659	6971			
SIPRI	LTPAQWFLR	11,8	+2	y8	1	5121	1970	4402	3732	10558	13528	14347	6356	8142			
					2	2532	8928	4936	3881	7864	6898	12737	6895	7095			
					3	3974	5438	4755	4521	6639	11107	10709	5395	6377			
				y10	1	10483	6123	11980	8072	19592	17196	28864	17864	16715			
					2	7459	6346	8184	8645	14523	18690	29890	13312	20828			
					3	4667	10875	9243	9464	10197	12129	20960	13222	15504			
	LTPAQWFLR	11,8	+2	y11	1	3448	2604	3475	2509	5322	4201	7016	4461	3873			
					2	1450	4568	2288	2836	3524	4495	9410	3378	4704			
					3	2191	3355	3201	1858	4383	4293	7490	2599	3873			
				y3	1	8864	2520	9674	7497	5392	2789	4601	2622	21107			
					2	12721	9273	10212	11039	3306	9121	4173	3674	6612			
					3	8053	8027	5305	7087	4537	6304	4240	9854	5433			
SIPRI	LTPAQWFLR	11,8	+2	y4	1	2849	1078	1782	1546	1039	1506	1384	2204	3037	2007		
					2	2368	3991	946	1423	1587	651	1130	3059	2000			
					3	2851	2801	1258	1772	2175	1306	2594	1385	3191			
				y5	1	64730	51195	26231	20642	17930	16472	5920	12611	22802			
					2	15218	103870	22657	19448	14098	20251	6841	10806	17710			
					3	66642	115710	20273	16656	13324	16883	7378	8077	20383			
	YITMLK	7,98	+2	y2	1	12601	5910	4183	4050	8915	10557	9963	5292	8232			
					2	4724	5498	2444	4209	5604	8628	12079	7747	23343			
					3	3817	6081	2936	4812	4311	2313	11432	6532	8895			
				b2	1	18039	21860	10107	11889	9587	21472	11090	13626	13623			
					2	9498	27175	9899	12183	9200	12842	10538	16110	16918			
					3	9222	19433	9462	13672	12107	15099	12614	11645	12792			
LTPAQWFLR	11,8	+2	y4	1	12189	18957	10255	21349	6095	12321	12883	16188	17258				
				2	12683	21864	10170	11536	8138	11228	13933	16910	16204				
				3	15400	23489	13948	9131	7314	12388	10898	15936	12688				
			y4	1	16582	13878	20761	24237	16499	10968	18821	12393	12106				
				2	21206	15917	18444	19742	17807	21996	12172	12756	13563				
				3	21904	17372	22119	25539	18588	22013	16748	14405	16834				

					Área del pico (UU.ÅÅ)											
					Control		1dpo		3dpo		7dpo					
					400	401	406	407	411	412	416	417	418			
Péptido	RT*	Carga	Fragmento	Análisis												
S1PR2	ETLDMQETTSR	7,64	y4	1	19698:	19323	11200:	17232	10453:	4276	16912:	17192:	14947			
				2	16995:	21276	10799:	13620	6432:	4396	17784:	14774:	12103			
				3	23019:	24068	12640:	13827	9581:	3385	19996:	26303:	11809			
			y5	1	221020:	173030	93483:	137350	57273:	37606	157590:	166850:	107980			
				2	192960:	278850	105350:	127310	56047:	22849	146980:	186960:	121210			
				3	190830:	226880	111440:	117930	53579:	17080	153830:	244140:	98939			
	EGSAFTILSASVFSLLAIAIER	7,43	y7	1	190380:	170250	81319:	113760	45057:	32052	123930:	112460:	76951			
				2	170300:	234780	88032:	103660	40792:	17348	107320:	137700:	84043			
				3	183180:	212710	89846:	111950	47114:	14950	136800:	192310:	59725			
			y3	1	92504:	37733	218380:	134990	186430:	257340	49771:	23522:	26917			
				2	26621:	65344	236920:	117480	180470:	220210	47295:	26554:	22413			
				3	34901:	37978	230310:	124930	183780:	178320	53700:	33056:	20761			
S1PR3	LVC[CAM]GC[CAM]LVK	7,7	y4	1	90535:	26042	437180:	236430	336450:	461450	74944:	20520	22627			
				2	25566:	57005	451510:	206050	323840:	418120	73376:	28956:	23831			
				3	44837:	38945	443250:	226370	340430:	319070	78387:	32614:	21733			
			y7	1	15178:	5879	78352:	44062	62067:	79820	13967:	2464:	57			
				2	4062:	8820	71244:	33036	51244:	63193	11011:	3092:	3079			
				3	7393:	6068	71939:	36783	54508:	50453	12115:	5024:	3892			
	EHYDVVGK	7,66	y3	1	19806:	30259	11150:	50938	23468:	40777:	29028:	24061:	23997			
				2	40046:	49756	11028:	26835	23778:	27086	33178:	28635:	22947			
				3	22311:	36926	12199:	29138	25291:	23119	29684:	36187:	25766			
			b3	1	18015:	29151	28325:	27179	29072:	22511:	31429:	26916:	31632			
				2	35142:	28646	25451:	26205	22788:	25294	27899:	31776:	32324			
				3	37911:	36792	30302:	25597	25141:	27884	24549:	22816:	32857			
S1PR4	TFQLSPVHWFLR	7,52	y6	1	35408:	37900	15269:	18223	11759:	22782:	27785:	20593:	24680			
				2	35116:	31985	28821:	31633	17567:	22147:	19704:	28109:	26798			
				3	39926:	45039	29185:	29661	13229:	19643:	26515:	36344:	24751			
			b4	1	12823:	10147	31242:	21145	22392:	17775	30845:	20836:	26381			
				2	15496:	18470	5670:	8843	24737:	17707	36197:	15725:	20286			
				3	39923:	19511	29022:	13885	31040:	27276	34775:	32840:	32392			
	ITEAHSGASTDSSLRPR	9,48	y5	1	7561:	94187	84619:	80170	80602:	67893	86754:	86388:	93292			
				2	90274:	40196	61593:	79253	78219:	70269	92156:	80447:	93663			
				3	73932:	79007	63842:	81090	77090:	72585	84965:	74995:	91958			
			b2	1	8631:	7149	10775:	11980	6645:	17014	10212:	13749:	14386			
				2	15550:	7065	9461:	7843	7780:	9087	9743:	12078:	11513			
				3	8988:	11688	9594:	6367	11824:	6393	7037:	11776:	13373			
S1PR5	C[CAM]LPPTLDR	8,7	y6(+2)	1	144970:	99774	330490:	221860	268500:	401240	190610:	87574:	71229			
				2	109400:	157440	267680:	204510	259840:	256910	119420:	83536:	72563			
				3	173680:	109420	270500:	203640	244000:	219310	86202:	92730:	69999			
			y7	1	2379140:	163590	244220:	163590	159900:	330550	205760:	122700:	17160			
				2	203640:	268480	276620:	223590	210790:	312670	204760:	71886:	19960			
				3	314530:	125070	217870:	289750	211530:	292530	229140:	79016:	59912			
	LSPALWFR	12,1	y5	1	10440:	8167	119740:	77515	119930:	146010	38183:	17272:	13726			
				2	20271:	25374	126630:	79707	115600:	113620:	34938:	15994:	21054			
				3	25439:	16878	129680:	75863	120210:	100350:	33877:	16573:	17743			
			y7(+2)	1	100860:	122080	1372600:	868750	1697400:	1050200	327130:	243470:	279290			
				2	117630:	109090	1422300:	951390	1875100:	1188000	389870:	278850:	307340			
				3	110630:	100640	1528700:	1071700	1916900:	1207900:	351270:	272330:	312050			
Tubulina	APQVSTPTLVEAAR	8,32	y8	1	13077:	7216	113210:	79424	148960:	79732	30141:	20633:	24657			
				2	19160:	16645	107580:	80647	137800:	96664:	41726:	23088:	28416			
				3	15392:	7020	127130:	79779	169570:	105630:	30421:	23810:	30798			
			y9(+2)	1	9893:	6398	77102:	41579	100940:	61680:	19977:	9287:	20696			
				2	9101:	10635	69575:	36504	91973:	62458	20734:	13708:	12766			
				3	5076:	5435	71053:	57777	85680:	57777:	11311:	15765:	15765			
	FPGQLNALDIR	10,5	y4	1	23008:	19304	70321:	62081	61704:	108790	22233:	25403:	47427			
				2	22221:	25807	47400:	71159	51156:	60628	24094:	24226:	47896			
				3	23187:	27143	73829:	72326	64709:	63749	24499:	34913:	66832			
			y5	1	26678:	33310	39255:	43985	40439:	42357:	30024:	37819:	38154			
				2	26793:	39145	35889:	39453	33496:	33305:	28333:	34884:	35561			
				3	23857:	32227	34436:	36793	35301:	29873:	29403:	34435:	36010			

Transiciones	QC (I): Relación Señal/Ruido									x̄ Control	1dpo
	Control								#406		
	#400				#401						
	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Mediana	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Mediana			
SPL_AGYPLEKPFDFR.2y3	3,429	4,111	4,060	>3	3,922	5,384	4,203	>3	>3	9,040	
SPL_AGYPLEKPFDFR.2y4	19,476	19,123	14,759	>3	15,262	16,936	18,029	>3	>3	35,845	
SPL_AGYPLEKPFDFR.2y5	1,516	2,816	1,156	N.D.	2,596	3,821	3,560	>3	N.D.	6,139	
SPL_TLPAQGMGTAEVLER.Q8R0X7.2y8	1,302	1,189	1,666	N.D.	1,054	3,288	2,202	N.D.	N.D.	3,898	
SPL_TLPAQGMGTAEVLER.Q8R0X7.2y10	5,485	5,255	4,421	>3	3,926	3,652	4,855	>3	>3	10,186	
SPL_TLPAQGMGTAEVLER.2y11	5,637	3,940	6,709	>3	3,847	6,753	5,135	>3	>3	7,359	
SphK1_MEPVEC[CAM]PR.2b3	0,395	0,476	0,497	N.D.	0,449	0,783	0,509	N.D.	N.D.	1,427	
SphK1_MEPVEC[CAM]PR.2y3	0,288	0,857	0,852	N.D.	0,279	0,710	0,631	N.D.	N.D.	4,692	
SphK1_MEPVEC[CAM]PR.2b6	0,346	1,297	1,081	N.D.	1,144	2,774	2,026	N.D.	N.D.	9,255	
SphK1_GLLPRPC[CAM]R.2b3	1,404	1,207	1,288	N.D.	1,110	1,397	2,246	N.D.	N.D.	2,143	
SphK1_GLLPRPC[CAM]R.2y5	5,618	10,335	11,423	>3	9,867	9,395	11,789	>3	>3	9,637	
SphK1_GLLPRPC[CAM]R.2y6	4,911	7,183	6,439	>3	7,126	8,214	7,986	>3	>3	6,225	
SphK2_LSYLPATTEPALPIGHSILPR.3y5	5,304	1,801	4,834	>3	4,802	2,882	2,432	N.D.	N.D.	2,809	
SphK2_LSYLPATTEPALPIGHSILPR.3y15(2+)	23,915	21,960	20,476	>3	18,259	22,265	16,192	>3	>3	20,008	
SphK2_LSYLPATTEPALPIGHSILPR.3y16(2+)	7,682	6,961	8,578	>3	3,711	4,566	6,144	>3	>3	5,260	
SphK2_GVPLSGDQIEITPELLPR.Q9JIA7.2b3	7,055	5,415	8,141	>3	3,336	10,424	9,279	>3	>3	4,292	
SphK2_GVPLSGDQIEITPELLPR.Q9JIA7.2y2	3,777	2,660	2,194	N.D.	3,102	3,240	3,287	>3	N.D.	4,580	
SphK2_GVPLSGDQIEITPELLPR.Q9JIA7.2y6	18,723	18,795	9,063	>3	8,301	10,634	13,462	>3	>3	1,694	
SPP1_ITIPLAC[CAM]K.2b5	17,639	18,274	20,066	>3	11,266	21,254	18,672	>3	>3	18,923	
SPP1_ITIPLAC[CAM]K.2y5	4,899	11,312	16,232	>3	5,119	4,549	9,795	>3	>3	15,219	
SPP1_ITIPLAC[CAM]K.2b6	15,008	9,466	7,377	>3	5,581	15,051	9,025	>3	>3	6,526	
SPP1_NSLTGEEGELVK.Q9J199.2y2	0,400	0,290	0,811	N.D.	0,839	0,709	0,513	N.D.	N.D.	1,365	
SPP1_NSLTGEEGELVK.2y3	0,562	0,932	0,756	N.D.	0,635	0,660	1,138	N.D.	N.D.	2,297	
SPP1_NSLTGEEGELVK.2y5	1,347	1,034	0,750	N.D.	1,654	1,057	0,534	N.D.	N.D.	5,128	
SPP2_WPRPSFPPVVR.3y3	69,058	31,963	10,853	>3	7,507	22,229	28,503	>3	>3	30,221	
SPP2_WPRPSFPPVVR.3y6	484,812	321,669	240,894	>3	52,615	386,890	213,292	>3	>3	193,837	
SPP2_WPRPSFPPVVR.3y7	558,052	259,365	296,147	>3	46,225	234,500	212,144	>3	>3	219,641	
S1PR1_YITMLK.2y2	7,422	5,203	5,239	>3	2,408	3,222	6,849	>3	>3	4,988	
S1PR1_YITMLK.2b2	7,979	4,837	6,218	>3	4,663	9,536	11,764	>3	>3	5,860	
S1PR1_YITMLK.2y4	12,504	8,522	12,143	>3	3,057	8,344	11,341	>3	>3	8,391	
S1PR1_LTPAQWFLR.2y4	2,988	3,251	3,748	>3	3,112	2,788	3,747	>3	>3	4,031	
S1PR1_LTPAQWFLR.2y5	1,035	4,325	3,172	>3	4,531	6,017	6,861	>3	>3	5,815	
S1PR1_LTPAQWFLR.2y7	3,442	4,880	5,407	>3	3,793	5,104	5,437	>3	>3	5,519	
S1PR2_ETLDMQETTSR.2y4	5,600	3,928	4,554	>3	7,252	8,153	4,848	>3	>3	2,348	
S1PR2_ETLDMQETTSR.2y5	20,075	26,953	23,673	>3	18,430	30,577	28,587	>3	>3	17,786	
S1PR2_ETLDMQETTSR.2y7	26,085	31,663	24,776	>3	26,390	33,419	37,407	>3	>3	30,998	
S1PR2_EGSAFITLSASFVSLIAIER.3y3	15,010	11,479	15,895	>3	10,658	14,105	10,007	>3	>3	48,547	
S1PR2_EGSAFITLSASFVSLIAIER.3y4	21,503	11,628	30,914	>3	12,326	19,810	22,697	>3	>3	82,551	
S1PR2_EGSAFITLSASFVSLIAIER.3y7	14,683	15,447	12,497	>3	15,822	11,960	12,582	>3	>3	66,849	
S1PR3_EHYDYGK.2b4	4,881	9,023	6,820	>3	2,807	4,604	11,603	>3	>3	7,204	
S1PR3_EHYDYGK.2y5	17,659	31,069	25,623	>3	8,020	10,753	27,934	>3	>3	30,890	
S1PR3_EHYDYGK.2y6	7,507	19,401	11,774	>3	5,229	4,948	10,351	>3	>3	13,515	
S1PR3_LVC[CAM]GC[CAM]LVK.2y3	2,715	4,730	4,150	>3	2,443	4,603	4,223	>3	>3	1,921	
S1PR3_LVC[CAM]GC[CAM]LVK.2b3	3,606	7,293	8,091	>3	3,280	4,203	6,724	>3	>3	5,803	
S1PR3_LVC[CAM]GC[CAM]LVK.2y6	4,225	4,419	5,913	>3	3,373	3,642	4,692	>3	>3	2,057	
S1PR4_ITEAHSGASTTSSLRPR.3b2	1,672	1,372	1,268	N.D.	2,058	2,210	1,832	N.D.	N.D.	10,289	
S1PR4_ITEAHSGASTTSSLRPR.3b4	0,783	1,187	1,355	N.D.	0,862	1,059	0,571	N.D.	N.D.	5,374	
S1PR4_ITEAHSGASTTSSLRPR.3y7	1,827	1,554	1,480	N.D.	1,969	1,839	1,177	N.D.	N.D.	11,936	
S1PR4_TFQLSPVHWFLR.Q9ZOL1.3b2	4,646	2,736	4,686	>3	2,234	3,320	2,643	N.D.	N.D.	9,246	
S1PR4_TFQLSPVHWFLR.Q9ZOL1.3y2	18,551	12,399	18,693	>3	8,795	14,218	7,295	>3	>3	14,784	
S1PR4_TFQLSPVHWFLR.Q9ZOL1.3y4	5,563	9,621	12,001	>3	3,142	7,766	6,916	>3	>3	40,313	
S1PR5_C[CAM]LPPTLDR.2b2	2,176	2,432	2,592	N.D.	1,155	1,803	2,064	N.D.	N.D.	4,133	
S1PR5_C[CAM]LPPTLDR.2y6(2+)	10,083	13,305	11,674	>3	8,537	7,994	15,646	>3	>3	17,362	
S1PR5_C[CAM]LPPTLDR.2y6	2,014	2,396	2,070	N.D.	2,831	2,469	1,983	N.D.	N.D.	3,350	
S1PR5_LSPALWFR.2y7(2+)	4,350	6,117	8,128	>3	6,249	8,418	8,169	>3	>3	6,523	
S1PR5_LSPALWFR.2y5	4,891	6,465	6,267	>3	6,497	7,324	7,959	>3	>3	5,850	
S1PR5_LSPALWFR.Q91X56.2y7	2,823	4,866	5,161	>3	3,791	5,915	5,696	>3	>3	4,074	
HBA_TYFPHFDVSHGSAQVK.2y11	36,946	22,879	23,296	>3	16,395	19,157	24,554	>3	>3	74,740	
HBA_TYFPHFDVSHGSAQVK.2y13	44,402	52,663	41,770	>3	25,642	36,876	40,760	>3	>3	105,285	
HBB_LHVDPENFR.2y5	54,149	44,360	39,943	>3	21,337	36,857	35,358	>3	>3	36,736	
HBB_LHVDPENFR.2y7	38,794	22,066	22,107	>3	11,853	23,069	17,036	>3	>3	38,983	
ALBU_APOVSTPTLVEAAR.2y8	67,176	71,419	70,868	>3	46,463	61,708	74,881	>3	>3	154,130	
ALBU_APOVSTPTLVEAAR.2y10	93,120	77,233	127,891	>3	52,064	65,744	73,246	>3	>3	164,358	
ALBU_YNDLGEQHF.K.2y6	30,428	4,637	3,483	>3	9,188	14,896	6,039	>3	>3	48,131	
ALBU_YNDLGEQHF.K.2y8	2,526	0,659	0,391	N.D.	1,744	1,578	0,548	N.D.	N.D.	5,538	
TUBB_FPGQLNADLR.2y9(2+)	32,012	29,953	26,930	>3	21,930	26,417	28,656	>3	>3	33,972	
TUBB_FPGQLNADLR.2y8	31,162	29,890	24,403	>3	19,588	28,920	30,024	>3	>3	28,985	
TUBB_LAVNMVPPFR.2y4	33,914	31,880	31,428	>3	31,643	42,149	36,235	>3	>3	37,372	
TUBB_LAVNMVPPFR.2y5	35,683	33,367	33,045	>3	31,116	41,651	36,593	>3	>3	32,028	
SPL_AGYPLEKPFDFR[+10].2y3	3,108	4,032	3,756	>3	1,530	3,705	3,053	>3	>3	3,327	
SPL_AGYPLEKPFDFR[+10].2y4	1,421	1,641	1,534	N.D.	2,027	1,827	1,772	N.D.	N.D.	1,281	
SPL_AGYPLEKPFDFR[+10].2y5	15,742	19,632	19,652	>3	14,332	25,542	28,161	>3	>3	12,352	

Sup.Mat. 6. La tabla muestra la relación señal/ruido obtenido para cada transición de los distintos péptidos en función de las replicaciones técnicas de cada muestra. El péptido AQUA™ se encuentra señalado con "[+10]". La mediana muestra como no detectables (N.D.) aquellas transiciones que presentan un ratio señal/ruido inferior a 3. Las transiciones sombreadas con gris claro corresponden a aquellas excluidas por no ser detectables en el promedio de los individuos control. Aquellas sombreadas con gris claro pero en negrita son las transiciones que a 1dpo presentan una relación señal/ruido superior a 10 y que, aunque presenten valores no detectables en individuos control, fueron incluidas en el estudio (criterio 3). Las sombreadas con gris oscuro fueron excluidas al suponer una única transición válida para un péptido (criterio 4). HBA=hemoglobina alfa; HBB=hemoglobina beta; Dpo=días post-operación.

Péptido y transición	QC (II)	QC (III)	
	CVadj	Mediana Pesos	IRQ
SPL_AGYPLEKPFDFR.2y3	0,001	1,000	0,000
SPL_AGYPLEKPFDFR.2y4	0,001	1,000	0,000
SPL_TLPAQGMGTAEVLER.2y10	0,005	1,000	0,085
SPL_TLPAQGMGTAEVLER.2y11	0,005	1,000	0,085
SphK1_GLLPRPC[CAM]R.2y5	0,024	1,000	0,077
SphK1_GLLPRPC[CAM]R.2y6	0,024	1,000	0,077
SphK2_LSYLPATTEPALPIPGHSLPR.3y15(2+)	0,027	1,000	0,000
SphK2_LSYLPATTEPALPIPGHSLPR.3y16(2+)	0,027	1,000	0,000
SphK2_GVPLSGDQEITPELLPR.2b3	0,012	1,000	0,082
SphK2_GVPLSGDQEITPELLPR.2y6	0,012	1,000	0,082
SPP1_ITIPLAC[CAM]K.2b5	0,018	1,000	0,000
SPP1_ITIPLAC[CAM]K.2y5	0,019	1,000	0,229
SPP1_ITIPLAC[CAM]K.2b6	0,018	1,000	0,000
SPP2_WPRPSFPPVVR.3y3	0,027	1,000	0,127
SPP2_WPRPSFPPVVR.3y6	0,027	1,000	0,000
SPP2_WPRPSFPPVVR.3y7	0,027	1,000	0,000
S1PR1_YITMLK.2y2	0,008	1,000	0,225
S1PR1_YITMLK.2b2	0,008	1,000	0,000
S1PR1_YITMLK.2y4	0,008	1,000	0,000
S1PR1_LTPAQWFLR.2y4	0,027	1,000	0,210
S1PR1_LTPAQWFLR.2y5	0,027	1,000	0,000
S1PR1_LTPAQWFLR.2y7	0,027	1,000	0,000
S1PR2_ETLDMQETTSR.2y4	0,008	1,000	0,650
S1PR2_ETLDMQETTSR.2y5	0,007	1,000	0,000
S1PR2_ETLDMQETTSR.2y7	0,007	1,000	0,063
S1PR2_EGSAFITLSASVFSLAIAIER.3y3	0,020	1,000	0,056
S1PR2_EGSAFITLSASVFSLAIAIER.3y4	0,015	1,000	0,000
S1PR2_EGSAFITLSASVFSLAIAIER.3y7	0,015	1,000	0,000
S1PR3_EHYDYVGK.2b4	0,010	1,000	0,000
S1PR3_EHYDYVGK.2y5	0,009	1,000	0,000
S1PR3_EHYDYVGK.2y6	0,008	1,000	0,000
S1PR3_LVC[CAM]GC[CAM]LVK.2y3	0,016	1,000	0,149
S1PR3_LVC[CAM]GC[CAM]LVK.2b3	0,007	1,000	0,000
S1PR3_LVC[CAM]GC[CAM]LVK.2y6	0,006	1,000	0,000
S1PR4_ITEAHSGASTTDSLPR.3b2	0,014	1,000	0,000
S1PR4_ITEAHSGASTTDSLPR.3y7	0,015	1,000	0,000
S1PR4_TFQLSPVHWFLR.3y2	0,014	1,000	0,000
S1PR4_TFQLSPVHWFLR.3y4	0,015	1,000	0,000
S1PR5_LSPALWFAR.2y7(2+)	0,025	1,000	0,000
S1PR5_LSPALWFAR.2y5	0,024	1,000	0,000
S1PR5_LSPALWFAR.2y7	0,025	1,000	0,000
HBA_TYFPHFDVSHGSAQVK.2y11	0,003	1,000	0,348
HBA_TYFPHFDVSHGSAQVK.2y13	0,003	1,000	0,348
HBB_LHVDPENFR.2y5	0,009	1,000	0,092
HBB_LHVDPENFR.2y7	0,009	1,000	0,092
ALBU_APQVSTPTLVEAAR.2y8	0,000	1,000	0,000
ALBU_APQVSTPTLVEAAR.2y10	0,001	1,000	0,000
TUBB_FPGQLNADLR.2y9(2+)	0,003	1,000	0,000
TUBB_FPGQLNADLR.2y8	0,004	1,000	0,000
TUBB_LAVNMVPFPR.2y4	0,016	1,000	0,097
TUBB_LAVNMVPFPR.2y5	0,016	1,000	0,097
SPL_AGYPLEKPFDFR[+10].2y3	0,016	1,000	0,051
SPL_AGYPLEKPFDFR[+10].2y5	0,011	1,000	0,051

Sup.Mat. 7. En la tabla se resumen los resultados de los controles de calidad basados en los tiempos de retención (QC(II)) y en transiciones inconsistentes (QC(III)). El péptido AQUA™ se encuentra señalado con "[+10]". CVadj=coeficiente de variación ajustado; IRQ=rango intercuartílico.

QC (IV)			
Condición	Muestra	Análisis	Mediana
7dpo	#418	1	1,000
		2	1,000
		3	1,000
	#417	1	1,000
		2	1,000
		3	1,000
	#416	1	1,000
		2	1,000
		3	1,000
3dpo	#412	1	1,000
		2	1,000
		3	1,000
	#411	1	1,000
		2	1,000
		3	1,000
1dpo	#407	1	1,000
		2	1,000
		3	1,000
	#406	1	1,000
		2	1,000
		3	1,000
Ctrl	#401	1	1,000
		2	1,000
		3	1,000
	#400	1	1,000
		2	1,000
		3	1,000

Sup.Mat. 8. La tabla muestra la mediana de los pesos de las diferentes muestras analizadas en el presente estudio. Dpo=días post-operación.

	Tratamiento	SPL (UU.AA)	Tubulina (UU.AA)
Exp. I	Ctrl	26515468	18506246
	Ctrl	25249489	23243903
	1dpo	55399175	17831489
	1dpo	61876832	25990045
	3dpo	53865924	23401702
	3dpo	55882560	23963480
	7dpo	43121681	24631338
	7dpo	36617681	25513903
Exp. II	Ctrl	2135891	7414518
	1dpo	23001681	12257761
	3dpo	13407296	18239640
	7dpo	2496790	10021347
Exp. III	Ctrl	1297648	5942912
	1dpo	15875267	7773054
	3dpo	10337832	12802974
	7dpo	3139497	8233054

Sup.Mat. 9. Densitometría de la expresión de SPL mediante Western Blot. La tabla muestra las medidas de densidad óptica obtenidas según la intensidad de las bandas correspondientes a SPL y beta-tubulina. En todos los casos, evitamos la sobreexposición de la señal para que los datos fuesen comparables entre las distintas muestras. Exp = experimento; Ctrl = control; dpo = días post-operación.

	Exp. I		Exp. II		Exp. III	
	Sgpl1	18S	Sgpl1	18S	Sgpl1	18S
Ctrl	29,941	15,615	30,061	16,857	33,177	17,808
1dpo	28,280	15,077	30,357	17,386	33,982	18,030
3dpo	28,431	15,483	28,000	16,933	34,448	18,401
7dpo	27,072	15,333	27,832	18,612	32,042	18,118

Mat.Sup. 10. Expresión de Sgpl1 tras la LME. La tabla muestra el ciclo umbral (Cycle threshold; Ct) de amplificación mediante qPCR de Sgpl1 y 18S. Exp = experimento; Ctrl = control; dpo = días post-operación.

		Blanco	1 mg/mL	3,3 mg/mL
Tiempo de incubación (h)	2,5	659	739	1024
		658	741	1054
		648	750	1042
	5	669	976	1575
		648	1010	1602
		649	1016	1578
	10	658	1460	2629
		663	1521	2634
		645	1523	2653
	20	889	2620	4766
		907	2590	4904
		1016	2550	5062

Sup.Mat. 11. Análisis del tiempo de incubación óptimo para el ensayo de actividad de SPL. En la tabla se muestran las distintas concentraciones de extracto celular de N2a analizadas, los tiempos de incubación con el sustrato fluorogénico estudiados y los datos obtenidos mediante análisis de fluorescencia. Blanco=solución tampón sin extracto de proteína, h=horas.

		Concentración total de proteína en médula espinal (mg/mL)							
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	Blanco
Con PLP	Exp. I	5135	4026	3245	2577	2073	1723	1523	1092
		5261	3962	3138	2527	2078	1787	1503	1064
	Exp. II	-	4783	3852	2922	2424	1975	1685	1219
		-	4728	3883	2944	2270	1915	1689	1194
	Exp. III	5518	5214	4317	3322	2606	2115	1835	1358
		6033	5486	4198	3333	2632	2088	1721	1399
Sin PLP	Exp. I	5154	4096	3174	2505	1979	1688	1454	950
		5325	4167	3190	2547	2012	1596	1432	1036
	Exp. II	-	4644	3712	2826	2370	1837	1470	1055
		-	4707	3787	2804	2187	1729	1395	1063
	Exp. III	6955	5446	4233	3294	2497	2040	1652	1204
		7115	5725	4433	3156	2463	1898	1610	1162

Sup. Mat. 12. Determinación de la concentración óptima de médula espinal. La tabla recoge los valores de fluorescencia a distintas concentraciones de proteína total (expresada en mg/mL) en muestras de extracto de médula espinal analizadas en presencia y ausencia de PLP, así como los valores de la muestra sin extracto proteico (blanco). Nótese que las medidas “con PLP” y “sin PLP” de cada ensayo corresponden, en todos los casos, a un doble análisis de la misma muestra. Exp = experimento; PLP = piridoxal-5'-fosfato.

		Ctrl	1dpo	3dpo	7dpo	Blanco
Exp. I	Con PLP	2084	1650	1932	2152	2015
		1913	1650	1974	2171	2066
Exp. II	Con PLP	1485	1778	1959	2088	713
		1456	1735	1875	1964	720
	Sin PLP	1351	1681	1865	1881	646
		1284	1657	1812	1935	713
Exp. III	Con PLP	1997	1541	1656	1829	685
		1831	1526	1529	1736	721
	Sin PLP	1793	1490	1535	1778	613
		1748	1487	1541	1725	632

Sup. Mat. 13. Determinación de la actividad de SPL a diferentes días post-operación. En la tabla se resumen los datos de fluorescencia obtenidos en los distintos ensayos, considerando los diferentes días post-operación analizados y el factor piridoxal-5'-fosfato (PLP). Exp = experimento; Ctrl = control; dpo = días post-operación.

Sup. Mat. 14 (página opuesta). La tabla muestra los valores alcanzados en la extremidad posterior izquierda (Izq.) y derecha (Dcha) en la evaluación de la función motora mediante el test BMS, como su promedio (valor considerado como Score) y los valores de Subscore según los días post-operación analizados y el genotipo del animal. Las letras A-R corresponden a los animales evaluados. Exp.= experimento; dpo= días post-operación; SubS= Subscore.

Parte I														
Exp. I	Genotipo	Animal	2dp0			7dp0			14dp0			21dp0		
			Izq.	Dcha.	Score	Izq.	Dcha.	Score	Izq.	Dcha.	Score	Izq.	Dcha.	Score
WT	WT	A	0	0	0	4	4	4	5	5	5	5	5	5
		B	2	0	1	3	4	3,5	5	5	5	5	5	5
		C	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		D	0	0	0	2	2	2	5	5	5	5	5	5
		E	2	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5
SPL +/-	SPL +/-	F	1	2	1,5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		G	3	4	3,5	5	5	5	7	7	7	7	7	7
		H	1	2	1,5	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		I	0	0	0	2	2	2	4	4	4	4	4	4
		J	0	0	0	3	3	3	4	5	4,5	5	5	5
WT	WT	K	0	0	0	4	4	4	5	5	5	5	5	5
		L	0	0	0	2	1	1,5	4	4	2,5	4	4	4,5
		M	1	2	1,5	2	2	2	5	5	5	5	5	5
		N	1	2	1,5	4	4	4	5	5	5	5	5	5
		O	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4
SPL +/-	SPL +/-	P	0	0	0	3	4	3,5	3	3	3	5	5	5
		Q	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		R	2	3	2,5	7	7	7	7	7	7	4	4	4

Parte II														
Exp. I	Genotipo	Animal	35dp0			42dp0			49dp0			56dp0		
			Izq.	Dcha.	Score	Izq.	Dcha.	Score	Izq.	Dcha.	Score	Izq.	Dcha.	Score
WT	WT	A	5	5	5	4	5	5	4	5	5	4	6	5
		B	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	5	5
		C	5	5	5	3	5	5	7	5	5	5	5	5
		D	5	5	5	2	5	5	3	5	5	2	5	5
		E	5	5	5	7	5	5	8	8	8	9	5	5
SPL +/-	SPL +/-	F	8	8	8	10	5	5	8	5	5	6	5	5
		G	5	5	5	7	5	5	7	8	8	9	7	7
		H	5	5	5	4	5	5	6	5	5	6	5	5
		I	5	5	5	3	5	5	3	5	5	3	5	5
		J	5	5	5	2	5	5	2	5	5	1	5	5
WT	WT	K	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
		L	5	5	5	0	5	5	4	5	5	1	5	5
		M	5	5	5	5	6	6	7	5	5	6	5	5
		N	5	5	5	4	5	5	4	5	5	4	6	6
		O	5	5	5	4	5	5	2	5	5	0	5	5
SPL +/-	SPL +/-	P	5	5	5	0	5	5	2	5	5	0	5	5
		Q	4	4	4	0	4	3	0	4	3	0	4	3
		R	5	5	5	8	5	5	8	6	6	9	6	6

Exp. I											
	Genotipo	Animal	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
			Latencia	RPM	Rot.Pasiva	Latencia	RPM	Rot.Pasiva	Latencia	RPM	Rot.Pasiva
-5dpo	WT	A	232	32	2	302	40	1	310	40	1
		B	65	11	-	106	16	-	244	33	1
		C	120	18	-	92	15	-	70	12	-
		D	135	20	-	232	32	1	279	37	1
	SPL +/-	E	210	-	-	290	38	4	323	40	-
		F	106	16	1	187	19	2	280	37	-
		G	28	7	-	83	14	-	77	13	-
-2dpo	WT	A	208	28	2	313	40	1	220	30	2
		B	281	37	2	305	40	0	255	36	1
		C	209	28	2	298	39	2	256	36	1
		D	266	35	2	292	39	1	309	40	0
	SPL +/-	E	321	40	2	305	40	1	305	40	1
		F	178	25	0	305	40	0	305	40	0
		G	130	19	0	305	40	0	305	40	0
7dpo	WT	A	37	8	0	68	13	0	98	15	0
		B	10	6	0	10	5	0	8	5	0
		C	39	8	0	46	9	0	91	14	0
		D	8	5	0	42	9	0	72	12	0
	SPL +/-	E	69	13	0	151	22	0	193	27	0
		F	106	18	0	54	10	0	84	14	0
		G	177	26	0	194	27	0	206	28	0
14dpo	WT	A	66	11	1	119	18	1	144	21	2
		B	54	10	0	65	11	0	41	9	0
		C	49	9	0	105	16	0	124	18	0
		D	65	11	0	54	10	0	36	8	0
	SPL +/-	E	150	22	0	131	19	0	135	20	0
		F	139	20	2	164	23	0	193	27	0
		G	241	33	1	251	34	0	199	28	0
21dpo	WT	A	62	12	0	76	14	0	49	10	0
		B	72	13	0	31	9	0	27	8	0
		C	122	18	0	41	10	0	119	18	0
		D	22	6	0	8	5	0	11	5	0
	SPL +/-	E	133	20	0	142	20	0	176	25	0
		F	168	24	1	184	25	0	115	18	0
		G	254	34	0	220	30	0	177	23	0
28dpo	WT	A	61	11	1	39	8	0	92	14	1
		B	12	5	0	27	7	0	5	4	0
		C	79	13	0	48	9	0	114	17	0
		D	18	6	0	27	7	0	40	8	0
	SPL +/-	E	122	18	0	134	20	0	125	19	0
		F	147	21	0	150	22	0	151	22	0
		G	82	13	0	213	29	0	206	28	0
35dpo	WT	A	110	17	0	60	11	0	87	14	0
		B	74	13	0	49	9	0	147	21	0
		C	128	19	0	82	15	0	30	7	0
		D	28	7	0	52	10	0	37	8	0
	SPL +/-	E	137	20	0	139	20	0	160	23	0
		F	183	25	1	185	26	0	231	31	0
		G	153	22	0	167	24	0	167	24	0
42dpo	WT	A	70	12	0	101	16	0	124	18	0
		B	114	17	0	47	9	0	62	11	0
		C	83	13	0	32	7	0	71	12	0
		D	51	10	0	63	11	0	58	11	0
	SPL +/-	E	147	22	0	194	27	0	181	25	0
		F	171	24	0	228	31	0	129	19	0
		G	217	30	0	207	28	0	247	33	0
49dpo	WT	A	62	11	0	73	12	0	116	18	0
		B	16	6	0	51	10	0	39	8	0
		C	33	8	0	65	11	0	75	13	0
		D	30	8	0	26	7	0	21	6	0
	SPL +/-	E	142	20	0	155	22	0	193	27	0
		F	206	28	0	169	24	0	207	29	0
		G	142	20	0	104	16	0	112	17	0
56dpo	WT	A	67	12	0	66	11	0	94	15	0
		B	106	16	0	94	15	0	95	15	0
		C	29	7	0	49	10	0	64	11	0
		D	23	7	0	18	6	0	19	7	0
	SPL +/-	E	179	25	0	215	29	0	211	29	0
		F	187	26	0	191	27	0	214	29	0
		G	102	16	0	186	26	0	189	26	0

Sup.Mat. 15 (esta página y la siguiente). La tabla muestra el tiempo de permanencia del animal sobre el cilindro rotatorio (tiempo de latencia; Latencia), la velocidad de giro alcanzada hasta la caída del animal (RPM, expresada en r.p.m) y el número de rotaciones pasivas que sufre cada animal, esto es, el número de veces que realiza una vuelta completa al cilindro (Rot. Pasiva). Las letras A-R corresponden a los animales evaluados. Exp.= experimento; dpo= días post-operación.

Exp. II											
	Genotipo	Animal	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
			Latencia	RPM	Rot. Pasiva	Latencia	RPM	Rot. Pasiva	Latencia	RPM	Rot. Pasiva
14dpo	WT	H	24	7	0	67	11	0	62	11	0
		I	100	15	0	135	20	0	147	21	0
		J	73	12	0	86	15	0	70	12	0
		K	87	14	0	109	18	0	96	15	0
		L	86	14	0	86	15	0	109	18	0
	SPL +/-	M	112	17	0	159	23	0	177	25	0
		N	118	18	0	127	20	0	101	16	0
		O	13	5	0	5	4	0	24	6	0
		P	60	11	0	85	14	0	106	16	0
		Q	20	6	0	13	5	0	38	8	0
21dpo	WT	R	142	20	0	129	19	0	122	18	0
		H	75	13	0	88	15	0	100	16	0
		I	150	22	0	151	23	0	164	23	0
		J	19	6	0	73	13	0	72	12	0
		K	74	13	0	110	17	0	110	17	0
	SPL +/-	L	123	18	0	132	19	0	132	19	0
		M	26	7	0	38	8	0	162	20	0
		N	17	5	0	65	11	0	90	14	0
		O	19	6	0	43	9	0	79	13	0
		P	48	10	0	94	16	0	88	15	0
28dpo	WT	Q	76	14	0	15	6	0	55	11	0
		R	128	20	0	162	24	0	160	23	1
		H	60	11	0	94	15	0	86	14	0
		I	130	20	0	144	21	0	160	23	0
		J	39	8	0	70	12	0	64	11	0
	SPL +/-	K	70	12	0	84	14	0	139	20	0
		L	128	19	0	127	19	1	157	22	0
		M	119	18	0	128	19	0	138	20	0
		N	32	7	0	48	9	0	63	11	0
		O	94	13	0	60	11	0	107	16	0
35dpo	WT	P	83	14	0	56	10	0	46	13	0
		Q	27	7	0	46	9	0	47	9	0
		R	116	17	0	87	14	0	159	22	0
		H	81	13	0	62	11	0	98	15	0
	SPL +/-	I	127	19	0	135	20	0	138	20	0
		J	67	11	0	66	11	0	86	14	0
		K	92	15	0	107	16	0	141	20	0
		L	123	18	0	133	19	0	157	22	0
		M	145	21	0	164	23	0	146	21	0
42dpo	WT	N	52	10	0	46	8	0	67	11	0
		O	109	17	0	110	17	0	74	12	0
		P	65	11	0	28	9	0	79	13	0
		Q	42	9	0	68	11	0	55	10	0
		R	154	22	0	194	27	0	171	24	0
	SPL +/-	H	61	11	0	65	11	0	91	14	0
		I	102	16	0	135	20	0	94	15	0
		J	82	14	0	80	13	0	77	13	0
		K	106	16	0	112	17	0	111	17	0
		L	119	18	0	130	19	0	111	17	0
49dpo	WT	M	151	22	0	143	21	0	181	25	0
		N	68	12	0	48	9	0	97	15	0
		O	116	18	0	123	18	0	115	17	0
		P	30	7	0	46	9	0	72	12	0
		Q	10	5	0	4	4	0	14	5	0
	SPL +/-	R	136	20	0	137	20	0	113	15	0
		H	16	6	0	57	10	0	51	10	0
		I	98	15	0	96	15	0	88	14	0
		J	49	10	0	71	12	0	57	10	0
		K	135	20	0	157	22	0	76	13	0
55dpo	WT	L	118	18	0	109	16	0	78	13	0
		M	122	18	0	161	23	0	147	21	0
		N	29	7	0	45	9	0	39	8	0
		O	111	17	0	119	18	0	139	20	0
		P	77	13	0	95	15	0	95	15	0
	SPL +/-	Q	3	4	0	16	6	0	23	6	0
		R	111	17	0	105	16	0	76	13	0
		H	23	6	0	108	16	0	69	12	0
		I	67	11	0	110	17	0	152	21	0
		J	62	11	0	73	12	0	78	13	0

Sup. Mat. 16 (página opuesta y las dos siguientes). La tabla muestra los registros obtenidos para cada animal en el Exp. I. n=4 ratones WT y n=3 ratones SPL+/- . HACTV= actividad horizontal; TOTDIST= distancia total (cm); MOVNO= número de movimientos; MOVTIME= tiempo en movimiento (s); RESTIME= tiempo en reposo (s); VACTV= actividad vertical; VMOVNO= número de movimientos en vertical; VTIME= tiempo en vertical (s); STRCNT= número de interrupciones en el sensor que ocurren durante el tiempo de estereotipias; STRNO= número de estereotipias; STRTIME= tiempo de estereotipias (s); CWREV= giros en sentido a las agujas del reloj; CCWREV= giros en sentido contrario a las agujas del reloj; MRGDIST= distancia recorrida por el margen del recinto (cm); MRGTIME= tiempo que pasa en el margen del recinto; CTRDIST= distancia en el centro (cm); CTRTIME= tiempo en el centro (s); LFTIME= tiempo en la parte delantera izquierda (s); RFTIME= tiempo en la parte delantera derecha (s); LRTIME= tiempo en la parte trasera izquierda (s); RRTIME= tiempo en la parte trasera derecha (s); RACTV= actividad de retroceso (hacia atrás); RMOVNO= número de movimientos de retroceso; RTIME= tiempo retrocediendo (s).

Genotipo		Animal	Replica	HACTV	TOTDIST	MOVNO	MOVTIME	RESTIME	VACTV	VMOVNO	VTIME	STRICT	STRNO	STRTIME	CMOVEV	MRGDIST	MRGTIME	CTRDIST	CTRTIME	LTFTIME	RTFTIME	RACTV	RMOVNO	RTIME		
Exp. I (Parte I)																										
WT	-5dpo	A	1 ^a	1285	641	57	74,9	231,1	120	38	44	571	144	63,8	5	424	143,1	143,1	230	152,9	14,8	7,7	9,9	98	11,8	
		B	2 ^a	1489	176	26	11,8	288,2	68	13	11,5	111	35	102,7	6	52	86,7	76	210,1	14,3	0,7	4,1	0	38	14,8	
		C	3 ^a	1269	579	62	66,6	232,6	68	27	19,6	875	58	102,7	6	479	236,1	99	64,9	6,4	0,9	36,3	61	27	19,6	
		D	4 ^a	1680	154	33	12,3	288,5	35	17	11,5	428	43	52,2	1	93	230,2	61	80,8	4,3	2,9	15,7	30	16	11,1	
		E	5 ^a	1868	995	78	119,1	180,2	113	41	29,5	1082	56	89,2	1	11	749	236,9	246	63,1	13,7	8,7	14,8	81	36	25
		F	6 ^a	1199	352	75	49,5	251,1	67	28	27,3	884	55	67	3	108	186,6	143	116,4	9,5	14	11,5	45	39	22,2	
		G	7 ^a	1236	546	69	58	242	113	50	33,1	585	51	54,4	1	374	177,3	172	122,7	21,4	15,6	18,7	90	50	27,8	
		H	8 ^a	131	131	27	14,7	285,3	20	13	13,6	313	43	42,7	1	59	96,3	71	202,7	0,1	2,8	5,3	49	24	11,4	
		I	9 ^a	1313	258	33	13,8	284,2	87	27	17,1	311	38	102,7	1	113	176,3	145	126,7	10,4	2,8	4,4	33	24	21,7	
		J	10 ^a	1313	258	33	13,8	284,2	87	27	17,1	311	38	102,7	1	113	176,3	145	126,7	10,4	2,8	4,4	33	24	21,7	
SP1 +/-	-5dpo	A	1 ^a	748	373	47	36,1	263,3	35	19	15	372	34	35	0	242	156,6	132	133,1	22,5	1,2	4,5	39	20	11,8	
		B	2 ^a	520	148	35	14,1	286,5	12	7	7,3	282	37	34,3	0	177	155,6	71	144,4	17,7	5,5	5,3	9	8	6,4	
		C	3 ^a	949	265	55	33,5	266,5	67	20	25,3	437	50	49,9	2	147	144,4	118	158,6	4,1	1,9	3,7	48	24	20,3	
		D	4 ^a	388	69	18	7,5	292,5	21	9	8,1	194	31	25,2	0	37	146	32	154	3	0,4	2	16	9	7,8	
		E	5 ^a	1103	433	59	52	248	71	35	24	623	47	71,6	1	279	194,2	154	108,8	14,3	4,9	11,1	58	34	23,1	
		F	6 ^a	871	206	41	24,6	275,4	48	25	26,3	506	48	71,8	2	109	207,7	97	96,3	20,1	7,6	8,8	0	45	26	24
		G	7 ^a	990	354	58	35,1	264,9	60	26	15,6	584	51	80,2	3	233	227,1	127	72,9	7,2	6,4	29,5	55	24	12,7	
		H	8 ^a	102	92	24	18,7	287,3	26	12	9,5	487	39	43,8	4	210	134,7	74	179,9	9,3	6,9	7,4	42	24	12,7	
		I	9 ^a	980	302	44	13,7	287,3	26	12	9,5	487	39	43,8	4	210	134,7	74	179,9	9,3	6,9	7,4	42	24	12,7	
		J	10 ^a	980	302	44	13,7	287,3	26	12	9,5	487	39	43,8	4	210	134,7	74	179,9	9,3	6,9	7,4	42	24	12,7	
WT	-2dpo	A	1 ^a	1617	549	88	63,5	292,2	17	8	11,6	211	31	22,7	0	319	169,4	291	239,6	2,2	2,8	0,1	13,4	16	9	10,4
		B	2 ^a	1148	353	72	33,5	266,5	88	32	33,3	590	46	53,9	1	228	205,9	125	94,1	34,8	6,8	21,2	41	65	32	31,7
		C	3 ^a	1512	144	28	13,4	286,6	29	15	12	237	34	33,8	1	85	230,4	59	80,6	60,2	2,7	0,1	2,6	22	15	10,6
		D	4 ^a	345	79	16	7	293	10	5	6,8	143	31	20,4	0	42	270,6	37	29,4	100,8	1,7	38,8	0	8	5	2,8
		E	5 ^a	415	137	18	12,2	286,8	18	8	7,2	241	30	36,4	0	83	73,2	50	226,8	1,3	1,5	1,2	14,4	38	8	6,3
		F	6 ^a	217	90	10	9,2	290,8	19	7	4,9	159	27	19,8	0	61	272,9	29	71,1	0,9	3,4	4,3	12	7	3,4	
		G	7 ^a	130	63	9	6,1	291,7	16	3	2,3	157	22	31,1	2	10	278,4	36	21,1	0,5	5,4	18,9	0	1	3,2	
		H	8 ^a	148	63	9	6,1	291,7	16	3	2,3	157	22	31,1	2	10	278,4	36	21,1	0,5	5,4	18,9	0	1	3,2	
		I	9 ^a	148	63	9	6,1	291,7	16	3	2,3	157	22	31,1	2	10	278,4	36	21,1	0,5	5,4	18,9	0	1	3,2	
		J	10 ^a	148	63	9	6,1	291,7	16	3	2,3	157	22	31,1	2	10	278,4	36	21,1	0,5	5,4	18,9	0	1	3,2	
SP1 +/-	-2dpo	A	1 ^a	560	55	11	12,5	287,5	0	0	0	451	44	106,7	0	38	274,4	17	22,6	9,7	11,2	2,7	1,8	0	0	0
		B	2 ^a	348	39	8	7,7	292,3	0	0	0	259	23	51,5	0	36	291,3	3	82,7	1,3	0,3	3,9	2,5	0	0	0
		C	3 ^a	348	39	8	7,7	292,3	0	0	0	216	25	36,8	0	32	179,9	54	127,1	119,5	0,9	0	0	0	0	0
		D	4 ^a	348	39	8	7,7	292,3	0	0	0	82	20	7,9	0	15	266,4	3	33,6	27,6	0	0	0	0	0	0
		E	5 ^a	348	39	8	7,7	292,3	0	0	0	383	33	99,8	2	122	278,9	63	21,1	36,9	34,1	4,1	0	0	0	0
		F	6 ^a	348	39	8	7,7	292,3	0	0	0	527	37	91,9	0	65	266,9	4	3,1	0,1	39,8	96,5	0	0	0	0
		G	7 ^a	348	39	8	7,7	292,3	0	0	0	275	30	52,4	0	64	278,5	20	21,5	163,9	4,5	2,6	1,8	0	0	0
		H	8 ^a	348	39	8	7,7	292,3	0	0	0	258	23	51,5	0	36	291,3	3	82,7	1,3	0,3	3,9	2,5	0	0	0
		I	9 ^a	348	39	8	7,7	292,3	0	0	0	185	28	47,5	0	1	280,3	5	1,7	280,6	0	0	0	0	0	0
		J	10 ^a	348	39	8	7,7	292,3	0	0	0	86	11	12,8	0	84	290,8	3	9,2	84	1,4	0	0	0	0	0
WT	-7dpo	A	1 ^a	257	104	14	14	286	0	0	0	129	19	19,7	0	68	155,5	36	144,5	0,1	2,7	46,2	30,7	0	0	0
		B	2 ^a	454	87	24	15	285	0	0	0	287	45	49,9	0	65	230,3	22	69,7	115,7	1,1	1,3	0	0	0	
		C	3 ^a	452	44	25	5,1	294,9	0	0	0	283	31	44,1	0	43	289,7	1	10,3	166,3	3,1	0,3	1,7	0	0	0
		D	4 ^a	353	105	16	14,1	285,9	0	0	0	216	27	33,4	0	100	276,6	5	23,4	0,3	12,8	8,5	11,3	0	0	0
		E	5 ^a	339	49	19	6,4	291,6	0	0	0	190	38	28,1	1	40	206,6	9	96,4	0,3	0	5,9	0	0	0	0
		F	6 ^a	407	107	22	14,6	285,4	0	0	0	275	30	52,4	0	64	278,5	20	21,5	163,9	4,5	2,6	1,8	0	0	0
		G	7 ^a	410	107	22	14,6	285,4	0	0	0	216	27	33,4	0	100	276,6	5	23,4	0,3	12,8	8,5	11,3	0	0	0
		H	8 ^a	386	145	19	23,8	277,2	0	0	0	187	25	23,8	0	132	241,8	17	58,2	0,2	0	0	0	0	0	0
		I	9 ^a	386	145	19	23,8	277,2	0	0	0	187	25	23,8	0	132	241,8	17	58,2	0,2	0	0	0	0	0	0
		J	10 ^a	386	145	19	23,8	277,2	0	0	0	187	25	23,8	0	132	241,8	17	58,2	0,2	0	0	0	0	0	0
SP1 +/-	-7dpo	A	1 ^a	379	40	10	9,3	290,7	0	0	0	185	34	29,3	0	23	119	37	181	0	0,3	4,6	0,6	0	0	0
		B	2 ^a	379	40	10	9,3	290,7	0	0	0	137	27	25,2	1	0	284,9	3	15,1	35,2	0	84,9	6,1	0	0	0
		C	3 ^a	379	40	10	9,3	290,7	0	0	0	208	38	42,1	0	23	261,8	1	36,2	4,5	2,7	0	0	0	0	0
		D	4 ^a	315	26	9	4,6	295,4	0	0	0	182	29	31,3	1	0	284,8	3	15,1	35,2	0	0,1	0	0	0	0
		E	5 ^a	311	83	13	12,5	287,5	0	0	0	182	29	31,3	1	0	284,8	3	15,1	35,2	0	0,1	0	0	0	0
		F	6 ^a	620	80	19	12,9	287,1	0	0	0	409	46	68,7	1	0	284,8	26	15,6	19,7	0,9	0,8	0,5	0	0	0
		G	7 ^a	242	44	17	14,																			

		Exp. I (Pwte II)																							
Genotipo	Animal	Réplica	HACTV	TOTDIST	MOVINO	MOVTIME	RESTIME	VACTV	VMOVNO	VTIME	STRICT	STRNO	STRTIME	CMREV	COMREV	MIRGDIS	MIRGTIME	CTRDIST	CRTIME	LFTIME	RFTIME	LRTIME	RTIME	RACTV	
WT	A	21	432	169	16	21.6	278.4	0	0	0	234	30	31.4	0	3	168	286.1	2	1.9	8.8	5.2	0.3	24.1	0	
	B	21	410	131	23	20.2	279.8	0	0	0	155	17	19.1	0	1	119	286.5	12	10.5	2.2	58.6	25.5	3.1	0	
	C	21	289	64	25	16	284	0	0	0	142	27	17	0	0	88	236.3	29	63.7	0	2.6	0.8	96.7	0	
	D	21	266	41	35	8.5	291.5	0	0	0	143	25	10.8	0	0	1	27	106.6	36	131.4	0	0.1	0	0	
	E	21	235	84	15	25	275	0	0	0	166	39	16.8	0	0	0	82	180.7	59	139.3	5.3	0.6	4.3	0	
WT	A	21	357	101	10	11.2	291.5	0	0	0	230	27	27.2	0	2	65	286.7	7	18.1	2.9	1.7	0.5	2.9	0	
	B	21	329	51	12	7.3	292.7	0	0	0	237	24	24.2	0	2	65	286.9	0	10.1	0.7	0.3	7.2	2.3	0	
	C	21	315	65	18	7.3	292.7	0	0	0	237	24	24.2	0	2	65	286.9	0	10.1	0.7	0.3	7.2	2.3	0	
	D	21	316	38	11	3.7	296.3	0	0	0	146	27	18.5	0	0	32	286.9	6	13.9	79.7	93.1	0.1	74.9	0	
	E	21	235	84	16	12.9	287.1	0	0	0	80	20	9.3	0	0	1	63	286.3	21	17.7	21.4	66.5	0	114	0
WT	A	21	237	53	10	4.1	295.8	0	0	0	142	26	19.3	0	0	39	68.8	13	233.2	0	0.7	0.4	3.4	7	
	B	21	181	20	5	4.1	295.8	0	0	0	101	25	17.4	0	0	1	29.4	0	8.6	0	4.5	0.7	1.8	0	
	C	21	615	155	192	19.2	280.8	374	44.1	2.2	374	50	35.7	1	0	83	132.1	72	167.9	6.3	0	1	19.1	34	0
	D	21	364	71	25	7.9	291.4	0	0	0	185	27	35.7	0	0	2	286	300	74	0	2.1	0	2.1	0	
	E	21	237	53	10	4.1	295.8	0	0	0	142	26	19.3	0	0	39	68.8	13	233.2	0	0.7	0.4	3.4	7	
WT	A	21	317	100	10	11.2	291.5	0	0	0	230	27	27.2	0	2	65	286.7	7	18.1	2.9	1.7	0.5	2.9	0	
	B	21	317	100	10	11.2	291.5	0	0	0	230	27	27.2	0	2	65	286.7	7	18.1	2.9	1.7	0.5	2.9	0	
	C	21	168	38	10	8.1	291.9	0	0	0	72	7	10.3	0	0	15	27.8	23	22.2	0	0.1	0.1	254.7	0	
	D	21	232	54	16	8.2	291.8	0	0	0	139	23	22.3	0	0	44	159.9	10	104.1	1.2	55.7	0.4	31.2	0	
	E	21	364	78	11	13.4	286.6	0	0	0	254	21	67.1	0	0	76	29.8	2	2.2	20.6	0	2.8	3.8	0	
WT	A	21	232	14	3	2.3	297.7	0	0	0	170	34	33.9	0	0	11	67.9	2	232.1	0	0.1	0.1	1.1	0	
	B	21	291	16	10	8.9	297.1	3	1	0.3	89	9	10	0	0	59	297.1	3	2.9	0.1	0	1.9	29.3	3	
	C	21	197	28	6	4.6	295.4	0	0	0	108	25	16.4	0	0	17	286	11	2	0.4	0	21.9	76	0	
	D	21	130	33	5	5.6	294.4	0	0	0	46	25	16.4	0	0	3	258.3	3	2	0.5	0.1	1	0	0	
	E	21	130	33	5	5.6	294.4	0	0	0	46	25	16.4	0	0	3	258.3	3	2	0.5	0.1	1	0	0	
WT	A	21	498	134	29	12.4	287.6	1	1	0	326	42	45.6	0	0	55	134.5	59	138.5	7.2	0.6	0.3	4.4	1.9	1
	B	21	275	77	14	1.8	288.2	0	0	0	112	24	16.6	0	0	14	162.4	13	137.6	0	1.1	1.2	1	1	0
	C	21	313	89	17	11.1	288.9	0	0	0	147	21	25.7	0	0	75	238.3	14	81.7	0.1	0.5	1.1	57.3	0	
	D	21	137	2	2	0	300	0	0	0	103	28	15.3	0	0	10	1	226.4	1	74.6	0	0	0	0	0
	E	21	590	249	33	35.6	284.4	0	0	0	220	23	23.9	0	0	4	241	286.2	3	18.7	8.7	5.5	0.6	0	
WT	A	21	485	113	24	17	283	0	0	0	303	40	46.1	0	0	80	19.2	33	142.6	4	6.1	17.4	1.1	0	0
	B	21	129	14	6	2.3	297.7	0	0	0	77	13	13.2	0	0	14	286.6	0	1.4	0	0	0	0	0	
	C	21	237	42	10	6	284	0	0	0	128	20	11.6	0	0	29	291	4	17	0	0	0	0	0	
	D	21	237	42	10	6	284	0	0	0	128	20	11.6	0	0	29	291	4	17	0	0	0	0	0	
	E	21	237	42	10	6	284	0	0	0	128	20	11.6	0	0	29	291	4	17	0	0	0	0	0	
WT	A	21	403	41	10	5.1	294.4	0	0	0	36	8	12.3	0	0	40	106.1	6	139.9	3.8	0.6	0.9	42.1	0	
	B	21	403	41	8	4.6	295.4	0	0	0	36	8	12.3	0	0	40	106.1	6	139.9	3.8	0.6	0.9	42.1	0	
	C	21	182	13	3	3	297	0	0	0	101	16	12.3	0	0	6	266.9	7	33.1	0.9	0	2.6	0	0	
	D	21	182	13	3	3	297	0	0	0	101	16	12.3	0	0	6	266.9	7	33.1	0.9	0	2.6	0	0	
	E	21	444	67	16	8.9	291.1	0	0	0	275	45	41.1	0	0	63	286.3	4	1.7	3.7	3	5	34.8	0	
WT	A	21	252	33	13	5.9	294.1	0	0	0	112	29	13.2	0	0	28	291.1	5	8.9	16.6	0	51.7	0	0	
	B	21	306	58	15	8.9	291.1	0	0	0	169	29	33.9	0	0	42	174.2	16	128.8	0.1	1.3	7	8.8	0	
	C	21	250	9	4	0.6	299.4	0	0	0	152	35	52	0	0	9	292.9	0	2.1	0	5.28	0	7.9	0	
	D	21	250	9	4	0.6	299.4	0	0	0	152	35	52	0	0	9	292.9	0	2.1	0	5.28	0	7.9	0	
	E	21	250	9	4	0.6	299.4	0	0	0	152	35	52	0	0	9	292.9	0	2.1	0	5.28	0	7.9	0	
WT	A	21	340	125	24	22.1	277.9	0	0	0	144	20	21.3	0	0	105	166.9	19	133.1	4.8	0.8	0	1	0	
	B	21	368	139	21	18.5	281.5	0	0	0	205	24	24.3	0	0	112	165.5	27	125.5	26.5	1.9	1.1	1.8	0	
	C	21	193	39	9	5.6	294.4	0	0	0	114	16	17.4	0	0	28	204.8	12	96.2	0	1.7	0	0	0	
	D	21	266	27	8	3	297	0	0	0	159	27	30.2	0	0	23	290.7	4	5.3	0.9	0	2.4	0	0	
	E	21	634	154	37	21.5	278.5	0	0	0	408	40	53.4	0	0	110	129.6	43	170.4	16.6	1.3	0.2	2	0	
WT	A	21	553	164	38	22.3	276.5	0	0	0	244	36	32.9	0	0	2	304	190.5	60	109.5	3.8	0.2	1.1	10.9	0
	B	21	385	116	14	13.8	284.2	0	0	0	230	34	35.2	0	0	116	288.2	0	1.8	0.8	0	0	0	0	
	C	21	385	116	14	13.8	284.2	0	0	0	230	34	35.2	0	0	116	288.2	0	1.8	0.8	0	0	0	0	
	D	21	275	45	10	8.9	291.1	0	0	0	169	29	33.9	0	0	42	174.2	16	128.8	0.1	1.3	7	8.8	0	
	E	21	275	45	10	8.9	291.1	0	0	0	169	29	33.9	0	0	42	174.2	16	128.8	0.1	1.3	7	8.8	0	
WT	A	21	318	22	6	3.9	296.1	1	1	0	223	30	30.3	0	0	14	286.3	3	3.7	17.8	0.4	0	0	0	0
	B	21	302	104	22	14.3	285.7	18	8	2.8	166	18	14.6	0	0	99	257.3	5	42.7	15.5	35.5	1.4	1.2	18	0
	C	21	129	11	4	2.9	297.1	1	1	0	80	14	15.7	0	0	11	299.9	0	0.1	0	6.4	12.4	0.8	1	0
	D	21	129	11	4	2.9	297.1	1	1	0	80	14	15.7	0	0	11	299.9	0	0.1	0	6.4	12.4	0.8	1	0
	E	21	284	15	7	1.9	298.1	0	0	0	199	23	45.7	0	0	10	234.3	5	45.7	0	0	0	0	0	0

Exp. I (Parte III)																									
Genotipo	Animal	Réplica	HACTV	TOTDIST	MOVINO	MOVTIME	RESTIME	VACTV	VMOVNO	VTIME	STRICT	STINO	STRTIME	CMREV	CMRGDIST	MRGTIME	CTRDIST	CRTIME	LTFTIME	RTFTIME	LRTIME	RRTIME	RACTV	RMOVNO	RTIME
42dpo	WT	A	259	96	17	13.6	286.4	0	0	0	159	19	16.3	0	2	276	18	24	4.5	0	0.1	0.4	0	0	0
		B	403	96	10	6.4	292.6	0	0	0	229	43	35.7	0	1	265.1	26	115.9	18.5	4.9	2.6	0	0	0	
		C	629	155	44	28.6	271.4	0	0	0	143	40	36.4	2	1	206.9	69	93.1	1.6	4.7	1.1	13	0	0	
		D	144	30	16	22.6	277.4	0	0	0	111	42	37.8	1	0	188	34	115.3	1.2	0.2	1.9	3	0	0	
		E	276	62	15	3.5	296.5	0	0	0	38	7	4.7	0	0	121.2	15	178.8	2.1	0.2	0	0	0	0	
	SPL +/-	A	239	117	19	10.5	289.5	0	0	0	132	23	32	0	1	202	32	120.2	0.4	0	2.8	0.9	0	0	0
		B	259	77	7	13.2	286.8	0	0	0	134	17	13.6	0	0	259.4	0	0.6	1.6	0	93.2	3.4	0	0	0
		C	423	101	11	11.3	291.5	0	0	0	91	18	11.1	0	2	300	0	0	1	0	144.5	6.5	0	0	0
		D	159	10	7	7	295.5	0	0	0	131	21	33.3	0	0	297	0	0	12.3	0	0	0	0	0	0
		E	304	42	8	8.5	291.5	0	0	0	112	18	17.3	0	0	297	0	0	1.3	24.5	1.5	2.3	1.1	0	0
SPL +/-	A	259	108	32	18	282	0	0	0	145	28	29.8	0	0	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	282	86	21	10	289.7	0	0	0	159	24	39.3	0	0	224	13	76	14.6	0	4.4	0	0	0	0	0
	C	353	147	19	20.3	279.7	0	0	0	138	25	21.8	0	1	249	31	51	12.1	0	7	2.8	0	0	0	0
	D	283	85	19	11.3	288.7	0	0	0	178	33	20	0	1	265.3	47	239.6	1.5	4.4	0	2.1	0	0	0	
	E	126	68	9	11.9	288.1	0	0	0	51	9	4.6	0	0	242.3	35	14.7	22.4	2.6	4.7	7.9	0	0	0	
49dpo	WT	A	255	27	8	4.3	295.7	0	0	0	88	13	11.1	1	0	288	4	32	18.7	0.2	0	0	0	0	0
		B	395	54	4	6.3	293.7	0	0	0	119	24	17.5	0	0	299.8	2	0.2	0	0	83.6	17.6	0	0	0
		C	183	27	7	8.3	291.7	1	1	0	119	8	21.3	0	1	298.3	2	4	1.7	0.2	0	23.6	1	1	0
		D	441	26	4	6	294	0	0	0	56	13	3.2	0	0	297.8	4	2.2	43.1	0.7	0	0	0	0	0
		E	59	1	1	0	300	0	0	0	37	6	7.5	0	0	297	0	3	5.9	0	0	0	0	0	0
	SPL +/-	A	259	112	16	16.2	283.8	0	0	0	143	15	31.6	0	2	293.1	4	1.9	0.7	0	5.5	12.4	0	0	0
		B	273	42	13	5	295	0	0	0	188	33	32.4	0	1	246.7	12	51.3	0	0.1	0.7	0	0	0	0
		C	400	3	2	0.5	299.5	0	0	0	139	33	22.4	0	0	299.9	0	0.1	0	0	53.6	0	0	0	0
		D	246	14	4	1.7	298.3	0	0	0	191	43	38.2	0	0	259.5	1	40.5	140.1	0	0.2	0	0	0	0
		E	118	12	5	2	298	1	1	0.1	42	13	6.1	0	0	300	0	3.9	166.8	0	0	47.4	1	1	0.1
SPL +/-	A	37	0	0	0	300	0	0	0	18	6	3.8	0	0	300	0	0	0	0	0	90	0	0	0	
	B	442	143	31	15.8	283.9	0	0	0	172	28	24.5	2	1	203	55	97	46	1.8	3.1	5.4	0	0	0	
	C	223	11	7	1.3	299	0	0	0	132	23	28.9	0	0	289.3	1	10.7	6.4	0	0	0	0	0	0	
	D	306	106	16	16.2	283.7	0	0	0	201	19	25.7	0	0	289	20	11	10.7	0.4	0.3	0	0	0	0	
	E	211	48	8	7.7	292.4	0	0	0	111	17	22.7	0	2	296.4	6	3.6	62.9	0	0.2	0	0	0	0	
SPL +/-	A	308	66	15	8.7	291.3	0	0	0	182	19	25.9	1	0	276.6	19	23.4	0	1.1	8.6	0	0	0	0	
	B	244	20	3	3.6	296.4	0	0	0	47	35	26.6	1	0	242	5	46	15.8	0	0.9	18.4	0	0	0	
	C	263	112	24	20.6	279.4	0	0	0	159	20	25.7	1	1	254	35	56	15.8	0	21.6	0.3	0	0	0	
	D	442	88	32	16.5	283.5	0	0	0	275	38	38	0	0	157.2	37	142.8	11.8	0	1.1	0.1	0	0	0	

Exp. I													Exp. II																			
WT													WT										SPL+/-									
A		B		C		E		F		G			H		I		J		K		L		N		O		P		Q		R	
Distancia (µm)	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T	Bl	T
-5400	36	58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-5200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-5000	37	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4600	26	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4200	28	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4000	39	58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-3800	26	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-3600	35	54	40	59	33	57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-3400	28	47	34	57	34	58	36	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-3200	30	47	-	-	-	-	33	55	42	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-3000	24	34	33	56	33	56	31	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2800	26	45	28	40	33	55	39	62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2600	29	44	28	49	30	53	38	58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2400	25	41	-	-	30	49	40	62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2200	26	41	29	49	33	54	35	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2000	22	38	-	-	30	50	28	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-1800	21	37	28	51	25	48	33	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-1600	18	35	-	-	24	43	41	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-1400	24	41	26	47	22	40	36	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-1200	19	37	25	44	22	40	41	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-1000	19	37	25	45	18	39	33	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-800	21	38	21	34	16	41	37	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-600	17	30	23	39	11	44	23	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-400	16	41	-	-	7	42	17	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-200	10	39	11	37	10	45	13	43	16	51	14	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	9	41	9	38	7	45	12	36	13	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	9	37	10	41	9	45	25	52	10	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400	13	41	16	41	18	48	31	54	24	57	36	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
600	17	37	29	44	30	50	37	57	30	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
800	24	41	27	44	29	49	37	57	36	58	32	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	25	39	29	48	32	54	39	59	36	56	36	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1200	30	42	33	51	36	58	41	63	40	64	34	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1400	25	42	30	47	36	57	39	66	31	43	38	58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1600	28	43	24	38	35	57	41	64	37	57	40	58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1800	24	46	35	57	33	59	42	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2000	29	48	37	58	33	61	40	70	46	70	36	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2200	30	49	-	-	39	68	38	65	32	56	37	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2400	30	50	34	58	38	66	34	58	43	58	41	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2600	33	55	-	-	37	66	42	71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2800	30	54	-	-	40	69	40	74	34	58	44	68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3000	34	55	-	-	36	72	46	76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3200	-	-	-	-	42	73	48	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3400	31	51	-	-	34	61	48	80	36	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3600	-	-	-	-	-	-	53	84	44	73	53	87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sup.Mat. 17. La tabla muestra el número de sondas de Cavalieri contadas en la superficie de sustancia blanca (Bl) y en la superficie total (T) de las secciones medulares analizadas para cada individuo. En todos los casos, los análisis fueron realizados en muestras extraídas a 56dpv. La distancia entre secciones es 200µm en el Exp.I y de 150µm en el Exp. II. La distancia "0" señala el epicentro de la lesión medular. Las letras A-R corresponden a los animales evaluados. Exp.= experimento.

Exp. I							Exp. II										
Distancia (μm)	WT			SPL+/-			Distancia (μm)	WT					SPL+/-				
	A	B	C	E	F	G		H	I	J	K	L	N	O	P	Q	R
-5400	62	-	-	-	-	-	-4050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-5200	-	-	-	-	-	-	-3900	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-5000	66	-	-	-	-	-	-3750	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4800	-	-	-	-	-	-	-3600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4600	55	-	-	-	-	-	-3450	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4400	-	-	-	-	-	-	-3300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4200	62	-	-	-	-	-	-3150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4000	67	-	-	-	-	-	-3000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-3800	68	-	-	-	-	-	-2850	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-3600	65	68	58	-	-	-	-2700	-	-	-	-	-	-	-	-	57	-
-3400	60	60	59	73	-	-	-2550	-	53	-	60	52	-	76	-	63	-
-3200	64	-	60	63	-	-	-2400	-	52	-	58	49	-	62	68	60	-
-3000	71	59	59	65	-	-	-2250	-	56	-	63	55	-	62	-	57	-
-2800	58	70	60	63	-	-	-2100	-	58	59	62	50	-	56	-	51	51
-2600	66	57	57	66	-	-	-1950	-	48	65	47	53	-	57	-	58	57
-2400	61	-	61	65	-	-	-1800	-	59	66	58	49	60	61	40	56	54
-2200	63	59	61	63	-	-	-1650	-	51	59	60	54	61	68	-	51	55
-2000	58	-	60	74	-	57	-1500	-	55	52	55	49	62	58	-	49	55
-1800	57	55	52	59	-	-	-1350	-	51	-	52	39	58	63	-	49	54
-1600	51	-	56	68	-	-	-1200	-	53	61	59	46	60	59	52	-	52
-1400	59	55	55	67	-	-	-1050	-	47	54	60	41	59	66	-	48	54
-1200	51	57	55	73	-	61	-900	-	46	62	48	35	54	67	54	46	58
-1000	51	56	46	63	-	59	-750	-	38	71	54	36	55	66	-	36	60
-800	55	62	39	73	-	70	-600	-	35	42	43	44	42	57	35	27	59
-600	57	59	25	55	-	59	-450	21	31	44	33	30	39	38	-	36	39
-400	39	-	17	40	-	52	-300	35	23	30	24	24	26	32	24	25	47
-200	26	30	22	30	31	33	-150	15	17	19	21	15	25	22	-	16	43
0	22	24	16	33	25	-	0	13	11	13	21	12	17	7	24	13	26
200	24	24	20	48	30	-	150	33	15	21	24	23	24	12	30	19	42
400	32	39	38	57	42	75	300	22	18	14	29	23	32	17	-	28	37
600	46	66	60	65	73	-	450	47	32	56	41	45	42	27	58	-	61
800	59	61	59	65	62	60	600	50	45	-	41	43	45	36	-	-	60
1000	64	60	59	66	64	60	750	51	51	57	54	53	61	50	63	59	63
1200	71	65	62	65	63	65	900	54	51	-	56	43	54	55	63	56	58
1400	60	64	63	59	72	66	1050	63	45	57	46	74	59	64	-	66	63
1600	65	63	61	64	65	69	1200	54	52	58	55	56	50	52	55	63	55
1800	52	61	56	63	-	63	1350	61	49	52	-	61	53	59	-	57	61
2000	60	64	54	57	66	55	1500	63	-	59	-	55	60	54	67	56	51
2200	61	-	57	58	57	61	1650	-	49	53	-	50	54	63	54	59	64
2400	60	59	58	59	74	62	1800	64	59	60	-	48	56	65	65	-	56
2600	60	-	56	59	-	61	1950	57	51	57	-	56	47	53	-	56	59
2800	56	-	58	54	59	65	2100	62	51	57	-	51	-	52	68	54	-
3000	62	-	50	61	-	64	2250	51	-	50	-	55	-	59	-	54	-
3200	-	-	58	60	-	61	2400	57	-	-	-	52	-	68	68	54	-
3400	61	-	56	60	59	-	2550	-	-	-	-	54	-	59	60	55	-
3600	-	-	-	63	60	61	2700	-	-	-	-	50	-	70	-	-	-
3800	-	-	-	-	-	62	2850	-	-	-	-	-	-	-	63	-	-
4000	-	-	-	-	59	-	3000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4200	-	-	-	-	55	-	3150	-	-	-	-	-	-	-	66	-	-
4400	-	-	-	-	-	-	3300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4600	-	-	-	-	61	-	3450	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4800	-	-	-	-	55	-	3600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5000	-	-	-	-	59	-	3750	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5200	-	-	-	-	55	-	3900	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5400	-	-	-	-	62	-	4050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5600	-	-	-	-	56	-	4200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5800	-	-	-	-	51	-	4350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6000	-	-	-	-	58	-	4500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6200	-	-	-	-	57	-	4650	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sup.Mat. 18. La tabla muestra el porcentaje de sustancia blanca respecto a la superficie total para las distintas secciones medulares analizadas en cada individuo. El porcentaje está estimado en base al número de sondas de Cavalieri contadas en cada sección medular (ver Sup.Mat.17). La distancia entre secciones es 200 μm en el Exp. I y de 150 μm en el Exp. II. Las letras A-R corresponden a los animales evaluados. Los datos empleados en los análisis estadísticos se encuentran señalados con un sombreado gris para facilitar su identificación. Exp.= experimento.

	Neuronas							Oligodendrocitos					
	WT				SPL+/-			WT			SPL+/-		
Distancia (mm)	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	E	F	G
-3,2	572	-	761	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2,8	420	-	678	-	596	-	-	225	-	-	-	-	-
-2,4	-	687	752	-	692	-		213	152	136	245	-	-
-2	242	514	546	782	723	-	617	137	156	147	213	-	-
-1,6	5	383	616	708	626	-	735	130	150	106	339	-	-
-1,2	11	350	403	323	521	-	566	145	198	86	324	-	303
-0,8	14	281	180	86	269	-	581	130	173	74	333	-	198
-0,4	4	33	9	21	6	-	-	57	101	81	237	89	97
0	0	0	0	0	0	0	0	39	57	58	121	58	79
0,4	410	89	0	3	165	137	9	36	60	74	277	25	107
0,8	631	539	36	333	578	838	299	59	138	199	330	136	280
1,2	655	655	609	568	674	780	755	92	260	251	-	-	351
1,6	717	658	819	572	754	923	707	141	264	332	-	-	359
2	871	761	865	637	-	735	848	-	-	355	-	-	447
2,4	86	713	-	769	-	870	738	-	-	-	-	-	446
2,8	-	-	-	668	-	661	-	-	-	-	-	-	-
3,2	-	-	-	912	-	910	-	-	-	-	-	-	-

	Astrocitos						Microglía						
	WT			SPL+/-			WT				SPL+/-		
Distancia (mm)	A	B	C	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G
-3,2	-	-	0,007	-	-	-	-	-	803	-	745	-	-
-2,8	0,038	-	0,005	0,011	-	-	-	-	823	1180	837	-	-
-2,4	0,043	0,018	0,004	0,010	-	-	-	1094	977	1656	696	-	-
-2	0,029	0,022	0,002	0,012	-	0,006	631	1170	1079	1704	789	-	939
-1,6	0,054	0,036	0,004	0,009	-	0,010	665	1194	1212	1668	837	-	1298
-1,2	0,059	0,037	0,005	0,019	-	0,011	796	1534	1465	1725	1031	-	1388
-0,8	0,053	0,033	0,004	0,012	-	0,017	1129	2182	1588	1557	1585	-	1788
-0,4	0,078	0,074	0,008	0,018	-	0,016	1013	1689	1668	768	1098	-	1704
0	0,091	0,044	0,016	0,022	0,005	0,022	1146	762	967	903	1333	1153	1235
0,4	0,078	0,036	0,006	0,010	0,014	0,018	1452	1484	886	1165	1816	1077	1565
0,8	0,075	0,022	0,008	0,014	0,006	0,008	1267	2294	1478	1668	2163	1508	1895
1,2	0,047	0,022	0,005	0,012	0,003	0,012	-	1950	1946	1837	1596	1241	1372
1,6	0,039	0,016	0,002	0,006	0,003	0,006	-	1644	1692	2101	1471	971	1229
2	0,030	0,015	0,003	-	0,003	0,004	-	1437	1372	1952	1625	1016	989
2,4	0,029	0,018	-	-	0,004	0,005	-	1499	1402	1100	1559	902	1018
2,8	0,038	-	-	-	0,002	-	-	-	-	1814	-	759	-
3,2	-	-	-	-	0,004	-	-	-	-	-	-	818	-

Sup.Mat. 19. Las tablas tituladas como “Neuronas”, “Oligodendrocitos” y “Microglía” muestran, de manera individualizada el número de neuronas, oligodendrocitos y células microgliales, respectivamente, identificadas en las distintas secciones medulares analizadas para cada individuo. La tabla “Astrocitos” muestra el porcentaje de pixeles con una intensidad >200 respecto al total de pixeles en una imagen de sección medular (0-255), como estimación de la abundancia de astrocitos reactivos. La distancia entre secciones medulares es de 400µm en todas las cuantificaciones. Las letras A-G corresponden a los animales evaluados. Los datos empleados en los análisis estadísticos se encuentran señalados con un sombreado gris para facilitar su identificación.

		[mg/mL]	Exp. I			Exp. II			Exp. III		
			Réplica1	Réplica2	Med ₀	Réplica1	Réplica2	Med ₀	Réplica1	Réplica2	Med ₀
Cerebro	Con PLP	10	4635	4363	3679	5302	5508	4457,5	5142	5462	4320
		8	3965	3891	3108	4670	4930	3852,5	5007	5318	4180,5
		6	3510	3532	2701	4093	4315	3256,5	4728	4545	3654,5
		4	3046	3173	2289,5	3604	3777	2743	3905	3924	2932,5
		2	2222	2263	1422,5	2692	2943	1870	2821	3004	1930,5
		1	1709	1781	925	2113	2100	1159	2095	2129	1130
		0,5	1267	1318	472,5	1526	1571	601	1618	1657	655,5
		0,25	1108	1109	288,5	1287	1258	325	1295	1324	327,5
		0,125	955	949	132	1080	1105	145	1151	1178	182,5
		Blanco	805	835	-	930	965	-	972	992	-
	Sin PLP	10	4056	4377	3488,5	5113	4991	4279,5	5582	5382	4724
		8	3885	3806	3117,5	4645	4497	3798,5	4817	4814	4057,5
		6	3525	3751	2910	3934	4046	3217,5	4396	4254	3567
		4	3095	3150	2394,5	3473	3465	2696,5	3606	3711	2900,5
		2	2249	2206	1499,5	2653	2701	1904,5	2826	2750	2030
		1	1735	1741	1010	1935	1977	1183,5	1955	1959	1199
		0,5	1205	1206	477,5	1433	1406	647	1472	1494	725
		0,25	1033	1069	323	1102	1126	341,5	1191	1118	396,5
		0,125	912	850	153	956	941	176	981	941	203
		Blanco	712	744	-	778	767	-	760	756	-
Timo (12 meses)	Con PLP	6	3373	3081	2139	2868	2840	1599,5	3335	3691	2153
		4	2332	2893	1524,5	2941	3005	1718,5	3910	3713	2451,5
		2	2013	1781	809	2614	3740	1922,5	3736	3871	2443,5
		1	2049	1970	921,5	3149	2792	1716	3995	3872	2573,5
		0,5	2044	2023	945,5	2568	2882	1470,5	3645	3738	2331,5
		0,25	1745	1857	713	2152	2414	1028,5	3273	3387	1970
		0,125	1558	1678	530	1833	1753	538,5	2844	3004	1564
		Blanco	1063	1113	-	1243	1266	-	1350	1370	-
	Sin PLP	6	3776	2950	2388,5	3065	2650	1720	3705	3739	2481,5
		4	2785	2307	1571,5	3421	3005	2075,5	3391	3617	2263,5
		2	2564	2003	1309	2208	2522	1227,5	3737	3683	2469,5
		1	2193	2098	1171	3218	3201	2072	3838	3941	2649
		0,5	1803	2124	989	2732	2790	1623,5	3838	3840	2598,5
		0,25	1776	1816	821,5	2252	2341	1159	3535	3548	2301
		0,125	1613	1560	612	1590	1504	409,5	3072	3081	1836
		Blanco	970	979	-	1117	1158	-	1218	1263	-
Timo (3,5 meses)	Con PLP	6	4450	4068	3483,5	4190	4219	3369	3985	3860	3126
		4	3105	2928	2241	3478	3311	2559	2991	2996	2197
		2	2197	2104	1375	2323	2267	1459,5	2185	2104	1348
		1	1484	1509	721	1658	1658	822,5	1559	1557	761,5
		0,5	1207	1188	422	1286	1290	452,5	1240	1283	465
		0,25	973	1018	220	1073	1077	239,5	1027	1035	234,5
		0,125	911	951	155,5	955	943	113,5	951	946	152
		Blanco	750	801	-	832	839	-	785	808	-
	Sin PLP	6	3581	3798	2990,5	3435	3643	2840	3249	3385	2617,5
		4	2560	2500	1831	2863	3117	2291	2633	2698	1966
		2	1752	1766	1060	1949	1982	1266,5	1896	1852	1174,5
		1	1347	1314	631,5	1452	1414	734	1443	1397	720,5
		0,5	1068	1067	368,5	1142	1133	438,5	1152	1087	420
		0,25	950	941	246,5	975	906	241,5	965	926	246
		0,125	883	896	190,5	876	862	170	897	870	184
		Blanco	683	715	-	701	697	-	706	693	-

Mat. Sup. 20. La tabla recoge los valores de fluorescencia a concentraciones crecientes de proteína total (expresada en mg/mL) en extractos de cerebro y de timo extraído de animales de 12 y 3,5 meses de edad, analizadas en presencia y ausencia de PLP, así como los valores de la muestra sin extracto proteico (blanco). Nótese que las medidas “con PLP” y “sin PLP” de cada ensayo corresponden, en todos los casos, a un doble análisis de la misma muestra. Exp.= experimento; Med0=medianavalor - medianablancos; PLP= piridoxal-5'-fosfato.

				Con PLP			Sin PLP		
				Réplica1	Réplica2	Med ₀	Réplica1	Réplica2	Med ₀
Médula espinal	Exp. I	SPL +/+	Control	1560	1619	858,5	1563	1506	896,5
				1598	1650	893	1585	1595	952
			7dpo	1989	1794	1160,5	1845	1782	1175,5
				1603	1642	891,5	1523	1509	878
				2041	2120	1349,5	1936	1977	1318,5
			Blanco	713	749	-	627	649	-
	Exp. II	SPL +/-	Control	1437	1511	675	1532	1591	885
				1768	1798	984	1690	1812	1074,5
				2056	2044	1251	2035	2067	1374,5
			7dpo	2058	2073	1266,5	2019	2077	1371,5
				2274	2286	1481	2260	2283	1595
			Blanco	799	799	-	686	667	-
Timo	Exp. I	SPL +/+	Control	1935	1949	1211	1947	1880	1275,5
				1809	1765	1056	1855	1750	1164,5
			7dpo	1664	1636	919	1728	1652	1052
				1690	1689	958,5	1785	1491	1000
				2109	1945	1296	2060	1957	1370,5
			Blanco	713	749	-	627	649	-
	Exp. II	SPL +/-	Control	2645	2739	1908	2606	2585	1898,5
				2658	2575	1832,5	2642	2424	1836
				2887	2738	2028,5	2683	2701	1995
			7dpo	2637	2661	1865	2503	2545	1827
				2686	2644	1881	2676	2599	1940,5
			Blanco	769	799	-	698	696	-

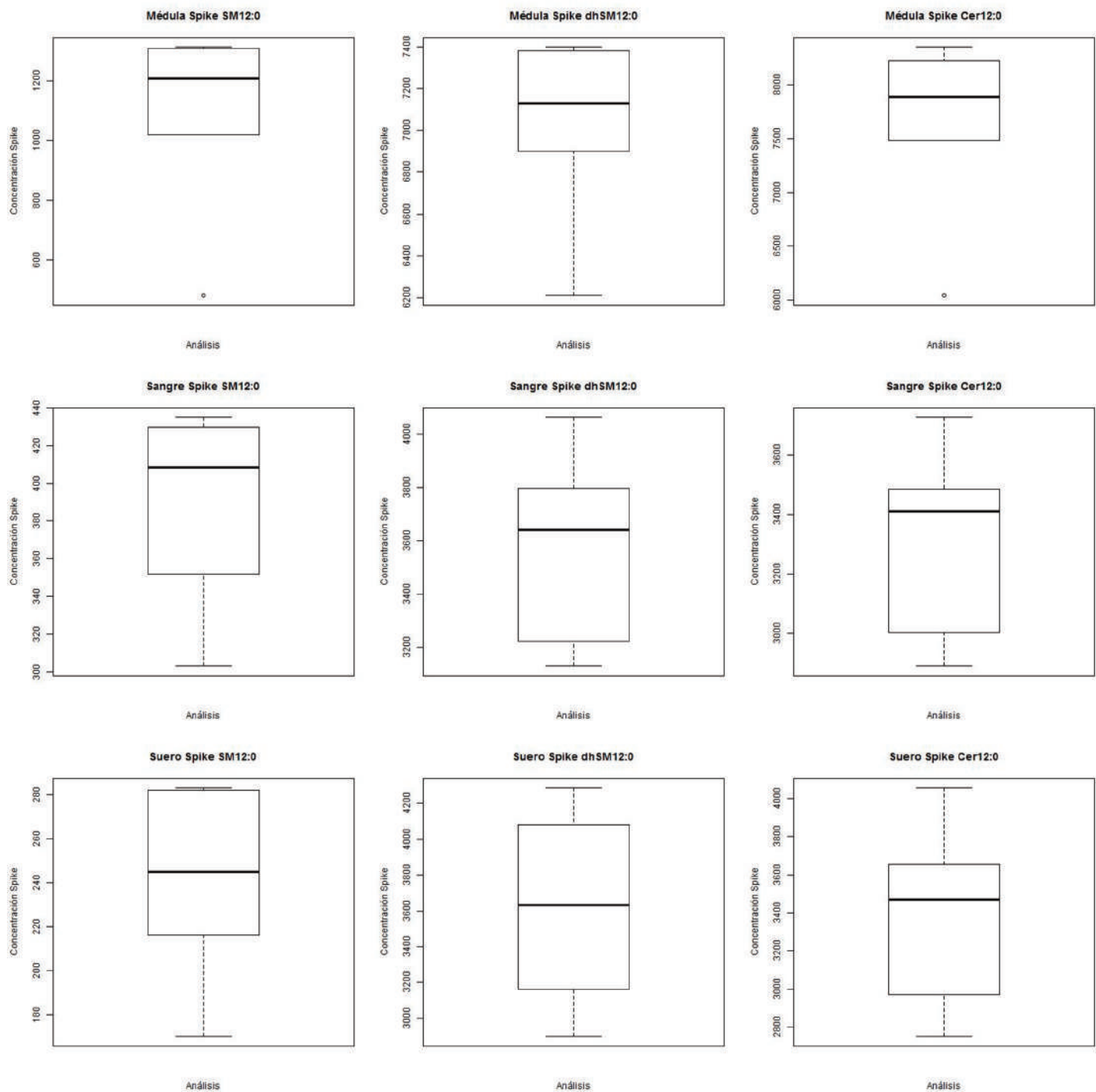
Mat. Sup. 21. La tabla recoge los valores de actividad de SPL (medida como UU.AA de fluorescencia) estimados mediante el ensayo de actividad de muestras de proteína (2,5mg/mL) de médula espinal y timo extraídas de animales de 3,5 meses de edad, analizadas en presencia y ausencia de PLP, así como los valores de la muestra sin extracto proteico (blanco). Las medidas “con PLP” y “sin PLP” de cada ensayo corresponden, en todos los casos, a un doble análisis de la misma muestra. Exp.= experimento; Med₀=medianavalor - medianablancos; PLP= piridoxal-5'-fosfato.

Sup. Mat. 22 (página opuesta y las dos siguientes). La tabla muestra en detalle las áreas de los picos de cada especie de esfingolípido analizada en médula espinal (22.A), sangre (22.B) y suero (22.C), su relación masa/carga (m/z), el tiempo de retención en el que se registra la elución del analito y la cantidad de muestra analizada (expresada en mg). Los datos marcados en gris corresponden a las medidas de los estándares internos o patrones (“spikes”). “R.T. (min)”= tiempo de retención en minutos. “N.D.”= No detectada

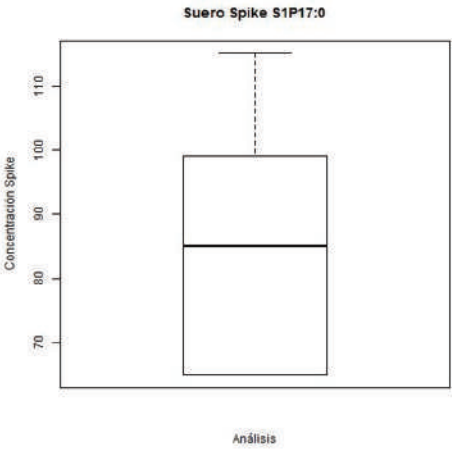
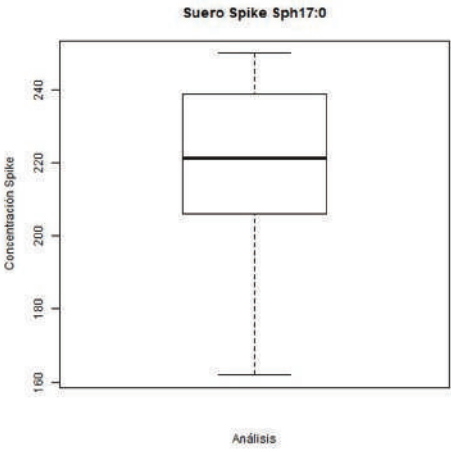
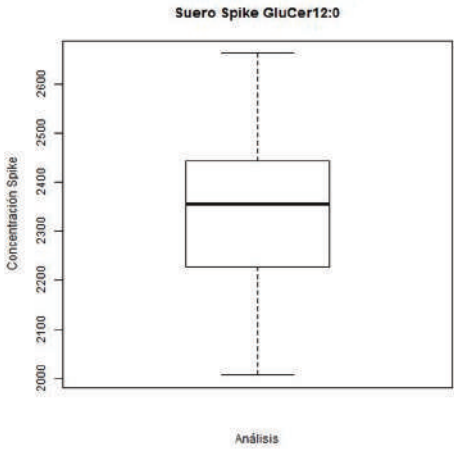
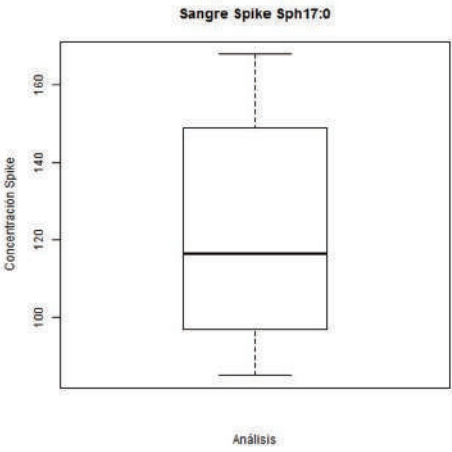
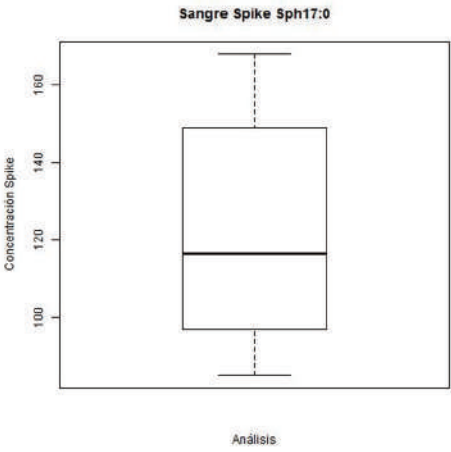
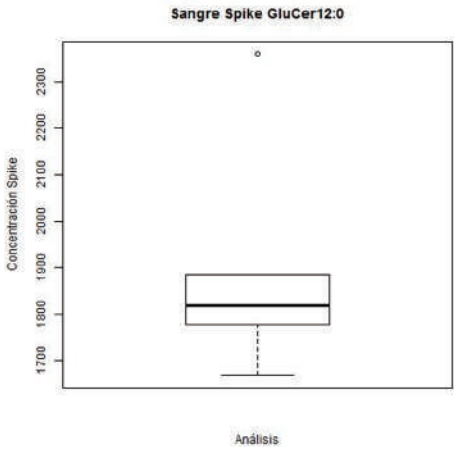
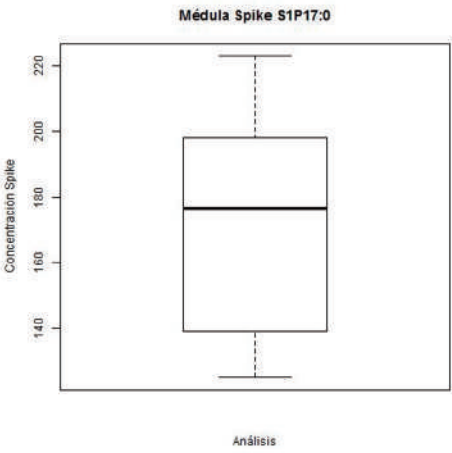
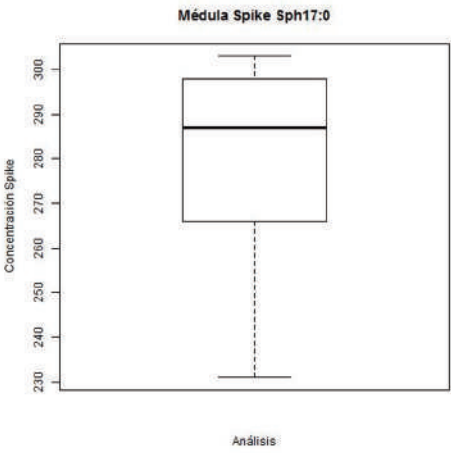
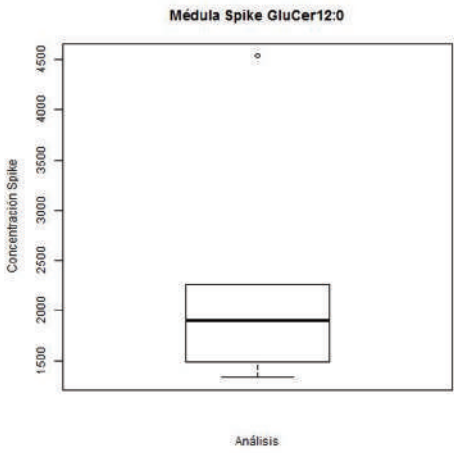
Datos Brutos								
Médula espinal								
			Control			7 días		
Ácido graso	m/z	R.T. (min)	LY202	LY203	LY204	LY213	LY214	LY215
Esfingomielinas								
12:0	647,513	4,93	480	1018	1241	1177	1313	1310
14:0	675,544	5,72	52	391	566	484	964	774
16:0	703,575	6,95	1646	2368	4430	4173	11241	7375
16:1	701,560	6,12	51	44	86	117	380	246
18:0	731,607	8,38	7111	23065	28851	22519	31801	29457
18:1	729,591	7,44	171	557	710	660	1866	1387
20:0	759,638	9,77	3485	15137	16371	11768	16032	14424
20:1	757,622	8,69	84	592	597	620	884	708
22:0	787,669	11,02	9120	19455	21335	17441	21928	21448
22:1	785,654	9,97	3180	12863	18346	15829	20159	18859
24:0	815,701	12,2	7495	18232	22356	15557	24129	23161
24:1	813,685	11,07	25854	7911	8547	8138	14638	17289
24:2	811,669	10,31	1101	2887	4399	2750	4126	3572
24:3	809,654	9,61	145	541	751	503	792	799
Dihidroesfingomielinas								
SM12:0	647,513	4,92	7381	7161	7397	7096	6211	6902
14:0	677,560	6,13	47	187	283	215	254	230
16:0	705,591	7,39	2608	2094	2843	3222	5057	3472
18:0	733,622	8,79	8070	13659	17355	16257	16837	16274
20:0	761,654	10,13	1999	3706	3937	3518	2892	2712
22:0	789,685	11,37	5185	4983	6653	5041	4451	4963
24:0	817,716	12,54	3986	2998	5208	5409	3413	4001
Ceramidas								
12:0	482,457	5,12	6039	7486	8353	8229	7584	8194
14:0	510,489	5,92	23	68	87	70	66	96
16:0	538,520	7,18	549	967	2035	1556	2151	2203
16:1	536,504	6,55	24	10	25	187	176	268
18:0	566,551	8,6	4480	8735	11021	8576	6348	10656
18:1	564,536	7,7	533	1267	1735	1483	767	2592
20:0	594,583	9,96	741	1273	1071	911	589	757
20:1	592,567	8,9	391	561	514	636	461	536
22:0	622,614	11,27	616	1044	1009	693	489	583
22:1	620,598	10,2	773	839	854	776	676	748
24:0	650,645	12,4	1216	2289	3050	2477	1787	2019
24:1	648,630	11,36	2347	4563	5205	3513	3826	4260
24:2	646,614	10,38	508	710	814	626	700	704
Dihidroceraidas								
Cer12:0	482,457	5,12	6039	7486	8353	8229	7584	8194
16:0	540,536	7,6	35	26	44	30	42	34
18:0	568,567	9	92	130	153	113	114	102
20:0	596,598	10	83	138	103	94	60	78
22:0	624,627	11,6	117	166	222	126	71	97
24:0	652,661	12,7	73	66	99	108	36	53
24:1	650,645	11,78	531	942	1197	874	959	922
Glucosil o galactosil Ceramidas								
12:0	644,510	4,75	4536	2262	1915	1894	1336	1486
14:0	672,542	5,51	181	393	461	312	335	266
16:0	700,573	6,57	521	2555	2990	2717	3446	3040
18:0	728,604	7,92	14281	28052	31332	32192	31158	31468
20:0	756,635	9,32	7421	14253	12680	13179	10820	10539
22:0	784,667	10,63	9777	13291	13405	11978	11325	12518
22:1	782,651	9,54	9265	17649	18924	17155	19049	19591
24:0	812,698	11,81	21710	28743	28890	28572	26088	28440
24:1	810,682	10,78	28687	39838	41221	36712	42014	41254
24:2	808,667	9,9	3078	5257	5261	4006	5116	4932
Lactosil Ceramidas								
GluCer12:0	644,510	4,75	4536	2262	1915	1894	1336	1486
16:0	862,626	6,26	23	54	79	99	187	136
20:0	918,688	8,96	26	35	48	42	57	61
24:0	974,751	11,5	N.D.	11	9	N.D.	7	N.D.
24:1	972,735	10,45	23	31	50	44	50	37
Esfingosina y similares								
Sa-C17	288,290	1,8	303	298	281	293	231	266
Sa-C17P	368,256	2	223	198	180	173	125	139
Sph	300,290	1,75	73	115	128	342	583	534
dhSph	302,306	1,9	20	39	52	89	153	123
S1P	380,257	2,1	23	54	72	164	290	232
mg médula			7,7	7,2	8,9	11	12	16

Datos Brutos								
Sangre								
			Control			7 días		
Ácido graso	m/z	R.T. (min)	LY202	LY203	LY204	LY213	LY214	LY215
Esfingomielinas								
12:0	647,513	4,95	401	435	416	352	303	430
14:0	675,544	5,72	390	456	408	245	207	322
16:0	703,575	6,88	11387	11730	15111	8473	7808	8900
16:1	701,560	6,06	761	795	963	573	519	645
18:0	731,607	8,28	2902	3240	3631	1664	1353	1583
18:1	729,591	7,36	95	93	97	75	79	84
20:0	759,638	9,7	1772	1841	1502	853	451	604
20:1	757,622	8,8	225	256	194	158	124	153
22:0	787,669	10,95	9441	9528	9945	6466	6293	7279
22:1	785,654	9,9	379	411	384	333	334	353
22:1	785,654	10,16	1337	1391	1362	801	745	988
24:0	815,701	12,17	19702	19374	20060	12283	12438	14429
24:1	813,685	11,1	13557	11131	14790	8634	8546	10222
24:2	811,669	10,28	5359	4656	5807	3077	2476	3946
24:3	809,654	9,39	196	149	206	81	101	130
Dihidroesfingomielinas								
SM12:0	647,513	4,95	3693	3797	3587	3225	3131	4061
14:0	677,560	6,1	31	37	44	26	24	31
16:0	705,591	7,39	6280	6016	6498	4715	5222	6495
18:0	733,622	8,81	3323	3371	2884	2010	1353	2362
20:0	761,654	10,12	907	967	630	726	430	786
22:0	789,685	11,37	2378	2204	2123	1701	1532	2298
24:0	817,716	12,54	3912	3701	3732	2253	2345	3451
Ceramidas								
12:0	482,457	5,12	3485	3370	3451	3003	2891	3726
16:0	538,520	7,18	444	488	513	373	435	406
16:1	536,504	6,55	47	42	28	22	31	31
18:0	566,551	8,6	190	221	307	135	188	134
18:1	564,536	7,7	10	14	17	6	10	7
20:0	594,583	9,96	153	174	152	154	172	177
20:1	592,567	9,1	14	15	16	15	18	11
22:0	622,614	11,27	1471	1546	1318	1142	1315	1356
22:1	620,598	10,2	30	37	30	38	43	41
22:1	620,598	10,5	53	82	47	55	54	53
24:0	650,645	12,4	6111	6141	5915	3154	4203	4804
24:1	648,630	11,36	1659	1700	1791	1432	1531	1627
24:1	648,630	11,7	254	292	231	171	183	200
24:2	646,614	10,6	267	279	292	182	186	220
Dihidroceraidas								
Cer12:0	482,457	5,12	3485	3370	3451	3003	2891	3726
16:0	540,536	7,61	139	147	135	76	84	96
18:0	568,567	9,02	160	146	150	58	84	92
20:0	596,598	10,36	42	49	53	51	48	53
22:0	624,627	11,59	276	305	344	221	274	305
24:0	652,661	12,68	1171	1334	1376	671	1008	1284
Glucosil o galactosil Ceramidas								
12:0	644,510	4,75	1778	1824	1812	1885	1668	2359
14:0	672,542	5,46	N.D.	10	15	13	N.D.	19
16:0	700,573	6,52	242	232	483	213	285	279
18:0	728,604	7,89	N.D.	N.D.	255	48	89	53
20:0	756,635	9,29	74	84	90	80	109	86
22:0	784,667	10,6	396	454	495	360	427	504
22:1	782,651	9,67	183	650	424	502	33	480
24:0	812,698	11,79	1078	1092	1189	456	766	1180
24:1	810,682	10,7	400	449	737	259	267	370
24:2	808,667	9,88	166	181	198	148	99	205
Lactosil Ceramidas								
GluCer12:0	644,510	4,8	1778	1824	1812	1885	1668	2359
16:0	862,626	6,28	101	94	101	83	82	100
18:0	890,657	7,6	15	14	13	9	4	N.D.
24:0	974,751	11,5	2	2	N.D.	2	2	N.D.
24:1	972,735	10,4	5	4	8	5	4	4
Esfingosina y similares								
Sa-C17	288,290	1,8	111	97	149	122	85	168
Sa-C17P	368,256	2	F.S.	F.S.	F.S.	F.S.	F.S.	F.S.
Sph	300,290	1,75	11	6	24	20	13	39
dhSph	302,306	1,9	30	27	61	26	26	52
S1P	380,257	2,1	91	88	99	84	66	79
	mL sangre		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Datos Brutos								
Suero								
			Control			7 días		
Ácido graso	m/z	R.T. (min)	LY202	LY203	LY204	LY213	LY214	LY215
Esfingomielinas								
12:0	647,513	4,93	216	220	283	282	170	270
14:0	675,544	5,72	45	92	159	121	55	188
16:0	703,575	6,95	135	1495	6150	3982	1816	5794
16:1	701,560	6,12	162	269	511	412	192	509
18:0	731,607	8,38	172	189	179	299	217	418
18:1	729,591	7,44	14	23	69	51	32	67
20:0	759,638	9,77	47	68	159	161	99	240
20:1	757,622	8,69	32	30	78	61	33	105
22:0	787,669	11,02	413	356	689	747	251	1489
22:1	785,654	9,97	46	50	112	80	42	160
22:1	785,654	10,3	132	191	271	291	159	410
24:0	815,701	12,2	373	90	114	130	61	1401
24:1	813,685	11,07	1900	2207	5422	102	85	6264
24:2	811,669	10,31	681	171	1384	707	141	1744
24:3	809,654	9,61	37	54	168	96	60	179
Dihidroesfingomielinas								
SM12:0	647,5128	4,93	3164	3641	4080	4286	2899	3622
14:0	677,560	6,16	11	18	27	17	10	21
16:0	705,591	7,37	643	863	1912	1478	934	1795
18:0	733,622	8,79	52	67	285	104	67	108
20:0	761,654	10,14	22	28	49	52	35	48
22:0	789,685	11,39	109	145	155	209	181	256
24:0	817,716	12,51	79	110	179	139	119	234
Ceramidas								
12:0	482,457	5,09	2969	3460	3653	4054	2751	3476
16:0	538,520	7,19	75	126	130	146	105	169
16:1	536,504	6,6	2	2	5	2	2	8
18:0	566,551	8,6	18	30	107	36	40	34
18:1	564,536	7,6	2	4	9	4	3	3
20:0	594,583	10,01	18	42	41	70	46	61
22:0	622,614	11,28	215	324	284	452	359	505
22:1	620,598	10,21	7	14	12	11	12	21
22:1	620,598	10,45	10	23	15	24	16	30
24:0	650,645	12,4	607	824	869	1289	816	1516
24:1	648,630	11,39	601	933	1366	1055	873	1235
24:1	648,630	11,67	56	84	1366	108	82	120
24:2	646,614	10,56	55	99	125	121	77	137
Dihidroceraidas								
Cer12:0	482,457	5,09	2969	3460	3653	4054	2751	3476
16:0	540,536	7,6	23	41	32	39	23	43
22:0	624,627	11,56	28	42	37	45	37	38
24:0	652,661	12,69	45	59	52	56	39	54
Glucosil o galactosil Ceramidas								
12:0	644,510	4,74	2321	2442	2391	2662	2007	2228
14:0	672,542	5,48	15	25	41	32	19	36
16:0	700,573	6,51	201	269	855	521	403	753
18:0	728,604	7,89	53	87	543	122	139	136
20:0	756,635	9,27	50	88	184	192	171	216
22:0	784,667	10,57	285	499	879	977	621	1249
22:1	782,651	9,5	19	32	51	47	58	71
24:0	812,698	11,75	256	368	727	504	683	1117
24:1	810,682	10,69	596	769	2046	1160	774	1628
24:2	808,667	9,88	115	158	308	229	140	303
Lactosil Ceramidas								
GluCer12:0	644,510	4,74	2321	2442	2391	2662	2007	2228
16:0	862,626	6,28	13	14	14	16	10	16
24:0	974,751	11,5	2	N.D.	3	4	2	5
24:1	972,735	10,4	4	3	8	7	3	5
Esfingosina y similares								
Sa-C17	288,290	1,8	215	239	250	228	162	206
Sa-C17P	368,256	2	99	115	65	65	72	98
Sph	300,290	1,75	6	7	4	8	5	8
dhSph	302,306	1,9	N.D.	N.D.	N.D.	3	1	3
S1P	380,257	2,1	45	74	55	52	42	98
	mL suero		0,07	0,07	0,1	0,1	0,06	0,1



Sup. Mat. 23 (está página y la siguiente). La figura muestra las gráficas individuales de los datos correspondientes a los "Spikes" en función del tipo de muestra y según el test "Box Plot".



Tejido	Familia	Valor	Q _{calculada}	Probabilidad	Outlier	Individuo
Médula espinal	SM	480	0,646	0,039	Sí	LY202
		1018	0,539	0,228	No	-
	dhSM	6211	0,583	0,080	No	-
	Cer	6039	0,625	0,050	Sí	LY202
		7486	0,113	0,466	No	-
	GluCer	4536	0,711	0,017	Sí	LY202
		2262	0,375	0,595	No	-
	Sph	231	0,486	0,194	No	-
S1P	223	0,255	0,822	No	-	
Sangre	SM	303	0,371	0,440	No	-
	dhSM	4061	0,284	0,717	No	-
	Cer	2891	0,134	0,662	No	-
	GluCer	2359	0,686	0,024	Sí	LY215
		1668	0,507	0,284	No	-
	Sph	168	0,229	0,923	No	-
Suero	SM	170	0,407	0,348	No	-
	dhSM	2899	0,191	0,920	No	-
	Cer	4054	0,308	0,634	No	-
	GluCer	2007	0,337	0,538	No	-
	Sph	162	0,500	0,173	No	-
	S1P	115	0,320	0,594	No	-

Sup. Mat. 24. En la tabla se muestran los resultados del test de Dixon sobre los valores extremos de los “spikes”. En cada caso se indica el tejido muestreado, la familia asociada al spike, el valor extremo en dicha serie, el factor Q_{calculada} correspondiente, la probabilidad de su pertenencia a la misma distribución del resto de datos y el individuo de origen.

Sup. Mat. 25.A (página opuesta y las dos siguientes). La tabla muestra las concentraciones, expresadas en pmol/mg, de las distintas especies de esfingolípidos en médula espinal (22.A), sangre (22.B) y suero (22.C) consideradas para futuros análisis. Los datos están normalizados con respecto al “spike” correspondiente y la cantidad de muestra analizada. Los “totales” se refieren a la sumatoria de las concentraciones de las distintas especies de una misma familia. El porcentaje de cada familia está definido como la razón entre el total de la familia (Familia Total) con respecto al total de esfingolípidos analizados en la muestra (Suma Total). “dpo”= días post-operación.

Médula espinal					
	Control		7 días		
Ácido graso	LY203	LY204	LY213	LY214	LY215
SM 14:0	10,67	10,25	7,48	12,24	7,38
SM 16:0	64,64	80,19	64,48	142,71	70,39
SM 16:1	1,20	1,55	1,81	4,83	2,35
SM 18:0	629,56	522,29	347,90	403,75	281,15
SM 18:1	15,22	12,85	10,19	23,68	13,24
SM 20:0	413,18	296,37	181,81	203,54	137,66
SM 20:1	16,16	10,81	9,57	11,22	6,76
SM 22:0	531,04	386,22	269,45	278,40	204,71
SM 22:1	351,10	332,12	244,54	255,94	180,00
SM 24:0	497,66	404,71	240,34	306,33	221,05
SM 24:1	215,94	154,72	125,72	185,85	165,01
SM 24:2	78,79	79,63	42,49	52,38	34,09
SM 24:3	14,77	13,60	7,77	10,06	7,62
SM Total	2839,93	2305,30	1553,55	1890,94	1331,41
%	57,94	53,11	49,39	47,50	48,21
dhSM 14:0	0,72	0,86	0,55	0,68	0,42
dhSM 16:0	8,12	8,64	8,26	13,57	6,29
dhSM 18:0	52,98	52,73	41,66	45,18	29,47
dhSM 20:0	14,38	11,96	9,01	7,76	4,91
dhSM 22:0	19,33	20,21	12,92	11,94	8,99
dhSM 24:0	11,63	15,82	13,86	9,16	7,25
dhSM Total	107,16	110,22	86,25	88,30	57,32
%	2,19	2,54	2,74	2,22	2,08
Cer 14:0	0,25	0,23	0,15	0,14	0,15
Cer 16:0	3,59	5,47	3,44	4,73	3,36
Cer 16:1	0,04	0,07	0,41	0,39	0,41
Cer 18:0	32,41	29,65	18,95	13,95	16,26
Cer 18:1	4,70	4,67	3,28	1,69	3,95
Cer 20:0	4,72	2,88	2,01	1,29	1,15
Cer 20:1	2,08	1,38	1,40	1,01	0,82
Cer 22:0	3,87	2,71	1,53	1,08	0,89
Cer 22:1	3,11	2,30	1,72	1,49	1,14
Cer 24:0	8,49	8,21	5,47	3,93	3,08
Cer 24:1	16,93	14,00	7,76	8,41	6,50
Cer 24:2	2,63	2,19	1,38	1,54	1,07
Cer Total	82,84	73,77	47,51	39,63	38,78
%	1,69	1,70	1,51	1,00	1,40
dhCer 16:0	0,10	0,12	0,07	0,09	0,05
dhCer 18:0	0,48	0,41	0,25	0,25	0,16
dhCer 20:0	0,51	0,28	0,21	0,13	0,12
dhCer 22:0	0,61	0,60	0,28	0,16	0,15
dhCer 24:0	0,24	0,27	0,24	0,08	0,08
dhCer 24:1	3,49	3,22	1,93	2,11	1,41
dhCer Total	5,44	4,89	2,97	2,82	1,96
%	0,11	0,11	0,09	0,07	0,07
GluCer 14:0	4,83	5,41	3,00	4,19	2,23
GluCer 16:0	31,38	35,08	26,09	42,99	25,57
GluCer 18:0	344,56	367,60	309,06	388,79	264,63
GluCer 20:0	175,06	148,77	126,52	135,01	88,63
GluCer 22:0	163,24	157,27	115,00	141,32	105,27
GluCer 22:1	216,78	222,03	164,70	237,70	164,75
GluCer 24:0	353,04	338,95	274,31	325,52	239,16
GluCer 24:1	489,32	483,63	352,45	524,24	346,92
GluCer 24:2	64,57	61,73	38,46	63,84	41,48
GluCer Total	1842,78	1820,47	1409,59	1863,60	1278,65
%	37,59	41,94	44,81	46,81	46,30
LacCer 16:0	0,66	0,93	0,95	2,33	1,14
LacCer 20:0	0,43	0,56	0,40	0,71	0,51
LacCer 24:0	0,14	0,11	N.D.	0,09	N.D.
LacCer 24:1	0,38	0,59	0,42	0,62	0,31
LacCer Total	1,61	2,18	1,78	3,76	1,97
%	0,03	0,05	0,06	0,09	0,07
Sph	10,72	10,24	21,22	42,06	25,09
%	0,22	0,24	0,67	1,06	0,91
dhSph	3,64	4,16	5,52	11,04	5,78
%	0,07	0,10	0,18	0,28	0,21
S1P	7,58	8,99	17,24	38,67	20,86
%	0,15	0,21	0,55	0,97	0,76
Conc. Total	4901,69	4340,22	3145,64	3980,81	2761,84

Sangre						
	Control			7 días		
Ácido graso	LY202	LY203	LY204	LY213	LY214	LY215
SM 14:0	1947,64	2095,36	1960,74	1393,95	1366,29	1497,68
SM 16:0	56816,33	53894,27	72651,34	48190,28	51455,40	41430,97
SM 16:1	3794,83	3651,93	4630,20	3258,38	3418,71	3003,24
SM 18:0	14478,30	14884,43	17457,16	9463,50	8916,98	7368,12
SM 18:1	474,15	425,39	467,80	428,45	517,85	388,80
SM 20:0	8842,30	8459,41	7219,89	4853,72	2970,32	2812,98
SM 20:1	1122,47	1174,25	932,42	898,45	817,07	713,60
SM 22:0	47105,41	43774,54	47812,17	36773,04	41473,05	33883,61
SM 22:1	1893,26	1887,69	1846,82	1894,46	2200,22	1642,52
SM 22:1	6669,02	6390,42	6547,35	4556,81	4912,57	4601,14
SM 24:0	98307,42	89013,68	96442,29	69857,91	81974,26	67167,31
SM 24:1	67646,99	51138,70	71105,35	49105,67	56319,94	47584,15
SM 24:2	26737,65	21390,75	27920,97	17497,90	16318,69	18368,04
SM 24:3	979,00	682,54	988,83	463,32	668,35	605,02
SM Total	336814,75	298863,36	357983,35	248635,86	273329,70	231067,17
%	94,39	93,56	94,26	94,15	94,04	93,03
dhSM 14:0	16,79	19,49	24,53	16,12	15,33	15,27
dhSM 16:0	3400,72	3168,93	3622,88	2923,89	3335,19	3198,26
dhSM 18:0	1799,30	1775,50	1607,95	1246,66	863,83	1163,04
dhSM 20:0	490,98	509,38	351,54	450,41	274,56	387,28
dhSM 22:0	1287,69	1160,76	1183,88	1054,94	978,63	1131,70
dhSM 24:0	2118,20	1949,68	2081,01	1397,38	1497,52	1699,32
dhSM Total	9113,67	8583,74	8871,79	7089,41	6965,05	7594,88
%	2,55	2,69	2,34	2,68	2,40	3,06
Cer 16:0	254,93	289,43	297,28	248,54	300,70	217,83
Cer 16:1	27,10	24,85	16,43	14,44	21,45	16,74
Cer 18:0	109,26	131,06	177,71	90,01	130,34	71,87
Cer 18:1	5,77	8,25	9,67	4,12	6,66	3,89
Cer 20:0	87,79	103,30	88,33	102,58	119,25	94,76
Cer 20:1	8,10	9,14	9,07	10,30	12,62	6,07
Cer 22:0	844,43	917,46	763,88	760,55	910,08	727,89
Cer 22:1	17,14	21,70	17,42	25,06	29,68	22,20
Cer 22:1	30,39	48,49	27,16	36,50	37,46	28,22
Cer 24:0	3507,14	3645,17	3428,00	2100,12	2907,56	2578,88
Cer 24:1	952,28	1009,20	1038,04	953,68	1059,28	873,51
Cer 24:1	145,82	173,11	133,72	113,58	126,87	107,58
Cer 24:2	153,41	165,47	169,21	121,46	128,91	118,36
Cer Total	6143,56	6546,64	6175,92	4580,92	5790,86	4867,80
%	1,72	2,05	1,63	1,73	1,99	1,96
dhCer 16:0	79,69	87,19	78,08	50,33	58,13	51,64
dhCer 18:0	91,65	86,65	87,11	38,37	58,44	49,42
dhCer 20:0	24,10	29,08	30,72	33,96	33,21	28,45
dhCer 22:0	158,18	181,11	199,17	146,96	189,33	163,70
dhCer 24:0	671,79	791,59	797,15	446,87	697,07	689,07
dhCer Total	1025,42	1175,63	1192,23	716,50	1036,17	982,28
%	0,29	0,37	0,31	0,27	0,36	0,40
GluCer 14:0	N.D.	10,65	16,66	13,99	N.D.	16,31
GluCer 16:0	272,25	254,85	532,79	226,17	341,70	236,78
GluCer 18:0	N.D.	N.D.	281,40	50,93	106,74	44,93
GluCer 20:0	83,59	91,71	99,23	85,02	130,19	73,28
GluCer 22:0	446,10	497,85	546,11	381,83	512,64	427,61
GluCer 22:1	205,89	712,59	467,89	533,08	39,18	407,06
GluCer 24:0	1212,64	1197,57	1312,09	483,79	918,32	1000,68
GluCer 24:1	449,78	492,46	813,27	274,69	320,35	313,67
GluCer 24:2	186,34	198,78	218,13	156,77	118,85	173,51
GluCer Total	2856,59	3456,46	4287,58	2206,26	2487,98	2693,84
%	0,80	1,08	1,13	0,84	0,86	1,08
LacCer 16:0	113,64	103,08	111,45	88,07	98,34	84,78
LacCer 18:0	16,88	15,35	14,35	9,55	4,80	N.D.
LacCer 24:0	2,25	2,19	N.D.	2,12	2,40	N.D.
LacCer 24:1	5,63	4,39	8,83	5,31	4,80	3,39
LacCer Total	138,39	125,01	134,63	105,04	110,34	88,17
%	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Sph	198,20	123,71	322,15	327,87	305,88	464,29
%	0,06	0,04	0,08	0,12	0,11	0,19
dhSph	540,54	556,70	818,79	426,23	611,76	619,05
%	0,15	0,17	0,22	0,16	0,21	0,25
Conc. Total	356831,12	319431,26	379786,43	264088,09	290637,74	248377,46

Suero						
Ácido graso	Control			7 días		
	LY202	LY203	LY204	LY213	LY214	LY215
SM 14:0	601,09	1189,78	1121,80	861,21	1036,42	1395,63
SM 16:0	1786,37	19392,93	43473,71	28261,94	34000,85	42962,81
SM 16:1	2144,05	3494,01	3613,60	2924,73	3598,42	3773,73
SM 18:0	2281,87	2455,66	1268,13	2119,54	4067,84	3100,71
SM 18:1	188,57	296,43	486,60	362,93	604,49	499,77
SM 20:0	625,63	883,06	1121,36	1139,89	1845,08	1781,17
SM 20:1	429,87	384,03	553,06	429,80	619,09	780,99
SM 22:0	5474,61	4615,07	4869,82	5300,12	4706,07	11038,10
SM 22:1	607,30	653,06	791,72	567,68	786,68	1186,34
SM 22:1	1748,27	2478,22	1915,67	2065,51	2977,21	3039,99
SM 24:0	4939,82	1164,97	808,93	924,29	1138,47	10390,13
SM 24:1	25168,36	28640,35	38326,81	724,87	1597,56	46446,27
SM 24:2	9014,77	2213,42	9781,58	5014,82	2634,10	12931,81
SM 24:3	493,71	694,89	1187,23	684,00	1130,03	1326,86
SM Total	55504,30	68555,87	109320,01	51381,35	60742,30	140654,29
%	90,42	89,81	91,49	87,67	84,47	92,90
dhSM 14:0	10,21	13,78	13,44	7,85	11,24	11,64
dhSM 16:0	580,15	677,41	937,07	689,94	1022,50	991,20
dhSM 18:0	47,03	52,62	139,62	48,55	73,87	59,68
dhSM 20:0	19,49	22,19	23,86	24,31	38,45	26,27
dhSM 22:0	98,19	113,78	76,21	97,44	198,47	141,12
dhSM 24:0	71,26	86,24	87,93	64,79	130,29	129,13
dhSM Total	826,33	966,03	1278,13	932,88	1474,81	1359,03
%	1,35	1,27	1,07	1,59	2,05	0,90
Cer 16:0	71,86	103,96	71,35	71,96	120,97	97,29
Cer 16:1	2,21	1,84	2,56	0,86	2,24	4,39
Cer 18:0	17,00	25,16	58,81	17,54	46,33	19,85
Cer 18:1	1,92	3,07	4,66	1,87	3,18	1,83
Cer 20:0	17,09	34,31	22,46	34,77	53,44	35,02
Cer 22:0	207,21	267,47	155,61	223,20	414,63	290,74
Cer 22:1	7,04	11,77	6,32	5,63	14,20	11,95
Cer 22:1	9,75	19,33	8,04	12,09	18,59	17,01
Cer 24:0	584,04	680,54	475,62	635,99	941,70	872,14
Cer 24:1	578,01	770,56	748,07	520,68	1007,84	710,82
Cer 24:1	53,60	69,49	748,07	53,23	94,54	69,16
Cer 24:2	53,02	81,96	68,57	59,81	89,29	79,03
Cer Total	1602,76	2069,44	2370,16	1637,63	2806,93	2209,22
%	2,61	2,71	1,98	2,79	3,90	1,46
dhCer 16:0	22,61	33,70	17,43	19,33	26,43	24,63
dhCer 22:0	26,82	34,34	20,38	22,17	42,77	21,71
dhCer 24:0	43,36	48,89	28,23	27,50	45,18	30,80
dhCer Total	92,78	116,93	66,04	69,00	114,39	77,15
%	0,15	0,15	0,06	0,12	0,16	0,05
GluCer 14:0	18,45	29,27	34,57	24,19	30,05	32,57
GluCer 16:0	247,93	314,31	715,19	391,74	637,55	675,69
GluCer 18:0	64,92	102,10	454,12	91,31	219,71	121,75
GluCer 20:0	61,82	102,52	153,86	144,56	270,93	194,14
GluCer 22:0	351,05	584,44	735,48	734,08	981,71	1120,97
GluCer 22:1	23,72	37,46	42,52	35,14	91,48	63,49
GluCer 24:0	315,44	430,12	608,38	378,36	1080,39	1002,35
GluCer 24:1	733,09	899,49	1711,86	871,73	1224,87	1461,39
GluCer 24:2	141,55	184,76	257,74	172,04	221,62	271,64
GluCer Total	1957,97	2684,47	4713,72	2843,14	4758,31	4943,99
%	3,19	3,52	3,94	4,85	6,62	3,27
LacCer 16:0	15,58	16,38	11,71	12,02	15,82	14,36
LacCer 24:0	2,46	N.D.	2,51	3,00	3,16	4,49
LacCer 24:1	4,92	3,51	6,69	5,26	4,74	4,49
LacCer Total	22,97	19,89	20,92	20,28	23,72	23,34
%	0,04	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02
Sph	79,73	83,68	32,00	70,18	97,98	77,67
%	0,13	0,11	0,03	0,12	0,14	0,05
dhSph	N.D.	N.D.	N.D.	26,32	19,60	29,13
%	-	-	-	0,04	0,03	0,02
S1P	1298,70	1838,51	1692,31	1600,00	1851,85	2000,00
%	2,12	2,41	1,42	2,73	2,58	1,32
Conc. Total	61385,54	76334,82	119493,28	58580,78	71889,89	151373,81

	Con PLP			Sin PLP		
	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. I	Exp. II	Exp. III
10 mg/mL	5101	12818	9048	2555	6528	3826
	4318	12356	8894	2612	6585	4005
8 mg/mL	7350	10397	6944	2498	5179	2812
	5599	10209	7311	2663	5423	3032
6 mg/mL	3146	9362	5979	1617	4018	2317
	2861	8727	5760	1612	4145	2278
4 mg/mL	2902	6917	4591	1633	2918	1679
	2914	6623	4486	1468	2897	1634
2 mg/mL	3145	4346	2782	1011	1757	1086
	1767	4198	2760	1044	1708	1084
1 mg/mL	1126	2556	1785	814	1148	839
	1131	2551	1800	787	1117	831
0,5 mg/mL	868	1583	1243	715	840	732
	860	1592	1225	715	814	716
0,25 mg/mL	788	1078	1032	720	701	704
	750	1090	1021	710	683	678
0,125 mg/mL	755	868	1014	728	665	732
	751	894	1005	724	660	716
Blanco	914	898	1081	853	770	820
	938	905	1131	863	757	809

Sup. 26. La tabla recoge los valores de fluorescencia a concentraciones crecientes de proteína total (expresada en mg/mL) en extractos de N2a, analizadas en presencia y ausencia de PLP, así como los valores de la muestra sin extracto proteico (blanco). Nótese que las medidas “con PLP” y “sin PLP” de cada ensayo corresponden, en todos los casos, a un doble análisis de la misma muestra. Exp.= experimento; PLP= piridoxal-5'-fosfato.

Sup.Mat. 27 (página opuesta). La tabla muestra los datos de viabilidad celular, medidos como absorbancia (UU.AA), de los cultivos celulares de N2a incubados durante 24, 48 y 72h a diferentes concentraciones de los inhibidores RBM-6.24, RBM-7.12 y RBM-7.32 (Parte - I) y JG-1, RX-115 y RX-116 (Parte - II). Control= muestra sin inhibidor; exp.= experimento; h= horas.

		Parte-I				
		Exp. I			Exp. II	
		24h	48h	72h	24h	48h
RBM-6.24	80µM	0,626	0,619	0,093	1,324	0,437
		0,731	0,707	0,095	1,434	0,535
		0,756	0,556	0,080	1,487	0,542
	40µM	0,928	0,864	0,621	1,332	0,905
		0,852	0,647	0,632	0,825	0,879
		0,985	0,942	0,644	1,225	1,046
	20µM	0,885	1,232	0,777	0,856	0,923
		0,790	1,027	1,046	0,724	0,965
		0,929	1,046	0,692	0,981	0,868
	10µM	0,612	F.M.	0,854	1,363	1,134
		0,637	F.M.	0,811	0,985	0,910
		0,888	F.M.	0,896	0,919	1,214
	Control	0,727	0,822	1,000	0,901	0,978
		0,720	0,999	0,936	1,026	1,052
		0,807	0,875	0,907	1,248	0,917
RBM-7.12	80µM	0,393	0,106	0,077	0,576	0,212
		0,340	0,109	0,102	0,532	0,224
		0,153	0,112	0,118	0,534	0,192
	40µM	0,383	0,159	0,123	0,999	0,295
		0,183	0,084	0,088	1,100	0,255
		0,221	0,157	0,084	0,956	0,251
	20µM	0,733	0,232	0,204	1,441	0,622
		1,009	0,144	0,195	1,184	0,517
		0,978	0,181	0,223	1,327	0,598
	10µM	1,132	0,974	0,529	1,828	1,347
		1,095	0,772	0,626	1,395	1,343
		0,759	0,888	0,595	1,473	1,342
	Control	1,201	1,490	1,444	1,500	1,838
		1,193	1,516	1,493	1,274	1,539
		1,161	1,521	1,604	1,512	1,855
RBM-7.32	80µM	0,980	1,147	0,641	1,197	0,674
		1,037	0,808	1,073	1,378	0,607
		1,256	1,006	0,996	1,335	0,566
	40µM	1,251	0,842	0,897	1,336	0,849
		0,841	0,840	1,106	1,307	0,911
		0,954	0,840	1,052	1,180	0,852
	20µM	1,056	0,379	0,944	1,282	1,076
		0,941	0,984	1,022	1,197	1,146
		0,986	0,764	1,095	1,093	1,203
	10µM	1,136	1,138	0,982	1,456	1,191
		0,641	1,073	1,030	1,477	1,107
		1,094	1,093	1,131	1,215	1,257
	Control	1,109	1,308	1,212	1,447	1,774
		1,271	1,277	1,253	1,580	1,368
		0,933	1,364	1,378	1,258	1,654

		Parte-II				
		Exp. IV	Exp. V	Exp. VI	Exp. VI	Exp. VI
		24h			48h	72h
JG-1	80µM	0,132	0,121	0,082	0,071	0,076
		0,140	0,117	0,076	0,075	0,074
		0,128	0,126	0,078	0,071	0,073
	40µM	0,152	0,125	0,182	0,131	0,106
		0,150	0,124	0,149	0,120	0,100
		0,141	0,121	0,195	0,233	0,098
	20µM	0,434	0,738	0,254	0,235	0,218
		0,481	0,669	0,245	0,196	0,221
		0,494	0,606	0,290	0,246	0,202
	10µM	0,974	0,707	0,277	0,291	0,436
		0,952	0,688	0,299	0,247	0,480
		1,022	0,683	0,322	0,240	0,454
	Control	1,827	1,556	0,364	0,403	0,881
		1,791	1,648	0,276	0,361	1,056
		1,748	1,529	0,273	0,385	0,918
RX-115	80µM	1,282	1,063	0,154	0,154	0,097
		1,131	1,007	0,161	0,120	0,089
		1,206	1,065	0,216	0,108	0,086
	40µM	1,615	0,651	0,364	0,233	0,227
		1,656	0,708	0,274	0,210	0,206
		1,566	0,744	0,754	0,220	0,194
	20µM	1,804	0,745	0,414	0,232	0,499
		1,678	0,751	0,342	0,248	0,477
		1,769	0,693	0,319	0,305	0,494
	10µM	1,530	0,781	0,352	0,331	0,874
		1,498	0,679	0,333	0,388	0,642
		1,349	0,674	0,300	0,290	0,584
	Control	1,827	1,556	0,491	0,385	0,796
		1,791	1,648	0,426	0,343	0,966
		1,748	1,529	0,412	0,342	1,143
RX-116	80µM	0,683	0,128	1,037	0,084	0,549
		1,151	0,123	0,855	0,275	0,072
		0,910	0,122	0,506	0,237	0,075
	40µM	1,554	0,619	0,778	0,744	0,094
		1,513	0,633	0,704	0,647	0,100
		1,322	0,538	0,666	0,646	0,098
	20µM	1,671	0,676	0,866	0,980	0,470
		1,671	0,681	0,974	0,819	1,183
		1,396	0,668	0,779	0,743	0,542
	10µM	1,499	0,737	1,019	0,980	0,910
		1,523	0,763	0,915	1,011	0,920
		1,329	0,683	0,865	0,777	0,862
	Control	1,827	1,556	0,807	0,990	0,987
		1,791	1,648	0,869	1,520	0,924
		1,748	1,529	0,914	0,819	0,862

	Control ¹		RBM-6.24		Control ²		RBM-7.12		RBM-7.32	
	Con IF	Sin IF	Con IF	Sin IF	Con IF	Sin IF	Con IF	Sin IF	Con IF	Sin IF
2h	F.M.	1658	1093	1230	1745	1523	873	1024	879	1024
	F.M.	1685	1088	1227	1816	1712	899	1035	902	1035
6h	1584	1615	1101	1032	1799	1874	879	1021	895	1021
	1575	1589	1078	1130	1786	1883	864	1052	901	1052
12h	1509	1599	1032	1182	1712	1797	897	1082	946	1082
	1458	1567	1017	1152	1707	1756	894	1061	955	1061
24h	1326	1399	983	1129	1623	1806	998	1174	1066	1174
	1377	1400	961	1116	1633	1458	1010	1177	1068	1177
48h	1219	1285	974	1127	1521	1545	1067	1199	1173	1199
	1207	1255	990	1112	1513	1604	1068	1199	1166	1199
72h	1161	1344	952	1134	1378	1467	1098	1321	1210	1321
	1151	1263	913	1063	1415	1554	1092	1252	1213	1252

Blanco	2h		72h	
	Con IF	Sin IF	Con IF	Sin IF
	515	482	568	548
	520	470	565	504
	530	484	598	493

Sup.Mat. 28. La tabla muestra los datos de actividad de SPL, medidos como fluorescencia (UU.AA), de los cultivos celulares de N2a incubados con RBM-6.24 (50 μ M), RBM-7.12 (25 μ M) o RBM-7.32 (25 μ M) durante 2, 6, 12, 24, 48 y 72h en presencia (Con IF) y ausencia (Sin IF) de inhibidores de fosfatasa. Control1= muestras sin inhibidor incubadas en presencia de DMSO (vehículo del inhibidor RBM-6.24) a una concentración similar a la empleada en las muestras con inhibidor. Control2= muestras sin inhibidor incubadas en presencia de H2O (vehículo de los inhibidores RBM-7.12 y RBM-7.32) a una concentración similar a la empleada en las muestras con inhibidor. h= horas; F.M.= fallo en la medida.

		Control ¹	RBM-6.24	Control ²	RBM-7.12	RBM-7.32	Control ³	JG-1	Control ⁴	RX-115	RX116
2h	Exp. I	600	565	601	491	534	38274	36496	41856	35268	35421
		559	570	604	490	535	39197	38400	41604	34588	35792
		571	560	598	480	543	42029	38572	42506	36880	37537
	Exp. II	37393	30720	33581	35079	32174	22416	15571	21730	20254	17348
		37096	30145	33747	35139	32483	21905	15866	22046	20766	17516
		37832	31347	34060	35480	33002	21830	15488	22608	20938	17106
24h	Exp. I	611	547	618	646	501	34717	39584	39277	36221	34891
		586	541	614	647	499	35967	41402	41753	37666	36577
		603	547	633	667	502	35724	42652	42972	38092	36861
	Exp. II	30898	27444	43777	-	31343	25556	13746	20806	19109	13389
		30497	28131	43910	-	31124	26376	14479	21903	15232	13634
		29340	27678	44559	-	31060	24847	14605	22415	15716	13427
Blanco	Exp. I	511					34909				
		492					34879				
		477					35186				
	Exp. II	25387					13189				
		25993					14673				
		25754					13702				

Sup.Mat. 29. La tabla muestra los datos de actividad de SPL, medidos como fluorescencia (UU.AA), tras incubar los cultivos celulares de N2a con RBM-6.24 (50 μ M), RBM-7.12 (25 μ M), RBM-7.32 (25 μ M), JG-1 (50 μ M), RX-115 (25 μ M) o RX-116 (25 μ M) durante 2 y 24 horas. Control1-4= medida control para los inhibidores mostrado a su derecha, esto es: 1= RBM-6.24; 2= RBM-7.12 y RBM7.32; 3=JG-1 y 4= RX-115 y RX-116; h= horas; exp.= experimento.

		Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV			Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV
ETO	Control	1,103	1,050	0,775	1,177	H ₂ O ₂	Control	1,317	1,095	0,767	0,989
		1,112	0,918	1,105*	1,061			1,178	0,996	0,797	0,817
		1,241	0,846	0,637	1,143			1,094	1,180	0,823	0,816
	1 µM	1,221	0,986	0,715	0,890		10 µM	1,150	0,796	1,057	1,114
		1,092	0,859	0,535*	0,889			1,043	1,073	1,010	0,826
		1,304	0,909	0,739	0,904			1,068	0,941	2,528	0,861
	3 µM	1,366	0,838	0,552	0,815		30 µM	1,273	0,844	0,996	0,763*
		1,101	0,830	0,567	0,778			1,095	1,048	0,856	0,972
		1,198	0,813	0,656	0,708			0,961	1,064	1,051	0,927
	10 µM	1,176	0,708	0,498	0,643		100 µM	0,843	0,768	0,876*	0,866*
		1,200	0,703	0,525	0,568			0,753	0,691	0,567	0,419
		1,218	0,735	0,485	0,574			0,832	0,993	0,609	0,572
	30 µM	1,173	0,652	0,488	0,476		300 µM	0,486	0,308	0,428	0,347
		1,102	0,603	0,501	0,451			0,090	0,244	0,412	0,304
		1,243	0,600	0,486	0,938*			0,467	0,238	0,410	0,896*
	100 µM	0,532	0,529	0,442	1,246*		Blanco	0,092	0,085	0,102	0,095
		0,527	0,466	0,398	0,639			0,087	0,080	0,108	0,086
		0,576	0,452	0,471	0,890			0,087	0,081	0,105	0,087
STS	Control	1,223	0,728	0,651	1,006						
		1,414	0,902	0,596	0,951						
		1,218	0,674	0,524	0,860						
	1 nM	0,812	0,781	1,013	0,772						
		0,788	0,778	0,874	0,804						
		0,813	0,738	0,735	0,736						
	3 nM	0,917	0,788	0,732	0,620						
		1,002	0,752	0,718	0,616						
		0,514	0,726	0,760	0,576						
	10 nM	1,095	0,690	0,667	0,649						
		0,776	0,639	0,737	0,431						
		0,716	0,610	0,618	0,419						
	30 nM	0,853	0,560	0,597	0,360						
		0,079*	0,574	0,689	0,367						
		0,820	0,543	0,606	0,356						
	100 nM	0,984	0,495	0,617	0,974*						
		1,025	0,476	0,654	0,567						
		0,928	0,512	0,549	0,497						
	300 nM	0,556	0,530	0,455	0,428						
		0,522	0,467	0,499	0,420						
		0,832	0,485	0,464	0,433						
	1000 nM	0,950	0,425	0,495	0,424						
		0,854	0,437	0,499	0,480						
		1,107	0,407	0,501	0,405						

Sup.Mat. 30. La tabla muestra los datos de viabilidad celular, medidos como absorbancia (UU.AA), tras incubar los cultivos celulares de N2a con etopósido (ETO; 24h), estaurosporina (STS; 24h) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂; 3h) a diferentes concentraciones del estímulo apoptótico. Exp.= experimento; Control= muestra no estimulada tratada con el vehículo correspondiente (DMSO para los ensayos de ETO y STS y H₂OmQ para peróxido de hidrógeno); Blanco= muestra sin extracto celular.

		Sin Sph			Con Sph (1 μ M)			Blanco
		Control	ETO (20 μ M)	ETO (20 μ M) + RX-116 (6 μ M)	Control	ETO (20 μ M)	ETO (20 μ M) + RX-116 (6 μ M)	
Sin Pre-trat.	Exp. I	0,917	0,463	0,491	0,671	0,460	0,461	0,089
		0,896	0,448	0,474	0,840	0,487	0,493	0,092
		0,852	0,537	0,596	0,691	0,503	0,441	0,090
	Exp. II	1,032	0,608	0,723	1,042	0,580	0,698	0,114
		1,168	0,575	0,658	0,873	0,527	0,636	0,103
		1,048	0,641	0,704	1,113	0,575	0,647	0,105
4h Pre-trat.	Exp. I	0,828	0,452	0,441	0,647	0,388	0,445	0,090
		0,703	0,479	0,421	0,635	0,431	0,445	0,090
		0,740	0,426	0,479	0,589	0,425	0,472	0,089
	Exp. II	0,864	0,458	0,698	0,941	0,527	0,705	0,137
		1,021	0,663	0,613	0,856	0,627	0,617	0,117
		0,946	0,626	0,701	1,004	0,548	0,691	0,108
20h Pre-trat.	Exp. I	0,748	0,420	0,467	0,606	0,410	0,464	0,088
		0,654	0,410	0,388	0,613	0,405	0,458	0,092
		0,719	0,419	0,508	0,621	0,459	0,438	0,088
	Exp. II	0,974	0,532	0,558	0,844	0,543	0,539	0,118
		0,870	0,544	0,520	0,824	0,519	0,547	0,109
		0,895	0,570	0,551	0,816	0,591	0,516	0,103

Sup. Mat. 31. La tabla muestra los datos de viabilidad celular, medidos como absorbancia (UU.AA) mediante MTT, en cultivos celulares de N2a con y sin suplemento de esfingosina exógena (Sph, 1 μ M), tanto sin previa incubación como incubados 4 y 20 horas antes de ser estimulados con etopósido (ETO, 20 μ M) durante 24 horas en ausencia y presencia del inhibidor RX-116 (6 μ M). Los datos mostrados corresponden a dos ensayos independientes. Control= muestra no estimulada tratada con DMSO o con DMSO y CHCl₃ en los ensayos suplementados con esfingosina; Pre-trat.= pre-tratamiento; Exp.= experimento; Blanco= muestra sin extracto celular.

		Médula espinal		Timo		Blanco
		Control	Tratado	Control	Tratado	
RX-116	Exp. I	30471	23761	42500	40709	13189
		30967	23183	39410	40373	14673
		31180	24407	37425	40157	13702
	Exp. II	27381	26391	40376	39861	11732
		25386	26785	40645	39611	11616
		27362	26825	40376	38298	12577
		22813	27075	F.M.	38452	11732
		22154	25825	F.M.	36661	11616
		23211	28272	F.M.	36517	12577
	RBM-7.32	28180	28777	43100	42897	16209
		28682	27603	41461	41572	14488
		28380	27959	42897	43831	14441

Sup. Mat. 32. La tabla muestra los datos de actividad de SPL, medidos como fluorescencia (UU.AA), en médula espinal y timo tras la administración intraperitoneal de RX-116 (25mg/Kg) o RBM-7.32 (50mg/Kg). Las muestras fueron extraídas 6 horas después de la administración. Control= animales tratados con vehículo (DMSO o H₂O para RX-116 y RBM-7.32, respectivamente); Blanco= muestras sin extracto proteico; Exp. = experimento.

